UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT de MICROBIOLOGIE – Directeur: Professeur V. BONIFAS

# Études biochimiques et sérologiques de 100 souches de Klebsiella isolées du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

THÈSE

Présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Lausanne
Pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

GEORGES COMNINOS
médecin diplômé de l'Université d'Athènes
originaire d'Athènes (Grèce)

Juris Druck + Verlag Zürich
1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0023

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT de MICROBIOLOGIE – Directeur: Professeur V. BONIFAS

# Études biochimiques et sérologiques de 100 souches de Klebsiella isolées du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

THÈSE

Présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Lausanne
Pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

GEORGES COMNINOS
médecin diplômé de l'Université d'Athènes
originaire d'Athènes (Grèce)

Juris Druck + Verlag Zürich
1977

# *Université de Lausanne*

## *Faculté de Médecine*

*Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de M. le professeur*

V. BONIFAS et Dr. E. BONARD, prof. associé,

*et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée:*

"Etudes biochimiques et sérologiques de 100 souches de Klebsiella isolées du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois".

*présentée par* Monsieur Georges COMNINOS

Médecin diplômé de l'Université d'Athènes,

*pour l'obtention du grade de* Docteur en médecine.

*Lausanne, le* 24 octobre *19* 77

UNIV. LEIDEN BIBL.

*Le Doyen:*

Prof. G. FAVEZ

A la mémoire de mon père

Au Professeur V. Bonifas, j'exprime ma profonde reconnaissance.

A ma femme Muguette

A ma mère

A ma famille

A mes amis

# TABLE DES MATIERES


Introduction 8

Chapitre 1. Taxonomie 10

1. A) Caractères des Enterobacteriaceae 10

1. B) Classification des Enterobacteriaceae 10

1. C) Les Klebsielleae 11

1. D) Le genre Klebsiella 11

1. E) Définition biochimique du genre Klebsiella 12

1. E. 1) Fermentations 12

1. E. 2) Epreuves diverses 12

1. F) Caractères fermentatifs de Klebsiella 13

1. F. 1) Réaction de Voges Proskauer 13

1. F. 2) Réaction du rouge de méthyl 14

1. F. 3) Réaction de la tryptophanase et production d'indole 14

Chapitre 2. Antigènes de Klebsiella et définition des sérotypes 15

2. A) Les antigènes de Klebsiella 16

2. B) Structure du polysaccharide capsulaire 17

2. C) Antigène O 21

2. D) Antigène M et substance visqueuse ("slime") 22

Résumé 24

Chapitre 3. Infections à Klebsiella 25

3. A) Généralités 26

3. B) Pneumonie 26

3. B. 1) Anatomie pathologique 26

3. B. 2) Complications 27

3. B. 3) Diagnostic 27

3. B. 4) Principaux signes différentiels entre pneumonie à Klebsiella et pneumonie à pneumocoques 28

3. B. 5) Etapes physiopathologiques de l'action de l'endotoxine pendant le choc septique à Klebsiella 29

3. C) Infection urinaire 30

3. D) Ozène 30

3. E) Rhinosclérome 31

3. F) Bactériémie (septicémie) à Klebsiella chez les cancéreux 31

3. G) Rôle et importance actuelle de l'infection à Klebsiella 33
Résumé 34

Chapitre 4. Relations entre taxonomie et gravité de l'infection 35
Résumé 38

Chapitre 5. Travail personnel. Matériel et méthodes pour les fermentations et les épreuves biologiques 39
5. A. 1) But du travail 40
5. A. 2) Ensemble de caractères étudiés 40
5. A. 3) Matériel et méthodes 41
5. A. 4) Résultats des épreuves biologiques et des fermentations 46

Chapitre 6. Sérologie 48
6. A. 1) Introduction 49
6. A. 2) Matériel et méthodes pour la sérologie 49
6. A. 3) Technique de préparation de l'antigène 50
6. A. 4) Agglutination 51
6. A. 5. a) Le gonflement de la capsule 52
6. A. 5. b) Technique de la coloration de la capsule 53
6. A. 5. c) Technique pour le gonflement de la capsule 54
6. B) Résultats et discussion 55
Résumé 58

Chapitre 7. Epidémiologie intrahospitalière 59
7. A. 1) Introduction 60
7. A. 2) Epidémiologie de Klebsiella aux Etats-Unis 60
7. A. 3) Nouvelle épidémiologie intrahospitalière 62

Chapitre 8. Phosphatase acide 65
8. A) Etude de la phosphatase acide. Introduction 66
8. A. 1) Mesure de l'activité phosphatasique 68
8. A. 2) Méthode utilisée pour la mesure de la phosphatase acide 69
8. A. 3) Préparation des solutions 69
8. A. 4) Conservation des solutions 70
8. A. 5) Technique de la mesure de l'activité phosphatasique 70
8. B. 1) Résultats de l'activité de la phosphatase acide selon des espèces 71

8. B. 2) Résultats de l'activité de la phosphatase acide selon les espèces et les types capsulaires 72

8. B. 3) Conditions métaboliques des Enterobacteriaceae qui utilisent le succinate comme source de carbone 73

8. B. 4) Conditions métaboliques des Enterobacteriaceae utilisant le glucose comme source de carbone 74

8. B. 5) Conditions métaboliques du milieu contenant Glucose + Succinate 75

8. C) Virulence et phosphatase acide 78

8. D. 1) Comparaison de l'activité phosphatique avec la gravité du tableau clinique 80

8. D. 2) Critères de gravité de l'infection à Klebsiella 80

8. E. 1) Résultats du travail expérimental personnel d'après l'étude clinique des dossiers des malades 88

8. E. 2) Variabilité de l'activité phosphatasique culture en milieux S' et GS' 93

Résumé 98

Chapitre 9. Sensibilité aux antibiotiques 99

9. A) La sensibilité aux antibiotiques 100

9. B) Facteurs de résistance aux antibiotiques 103

9. C) Matériel et méthodes 104

9. C. 1) Résultats des antibiogrammes 104

9. C. 2) K. aerogenes 105

9. C. 3) K. species 105

9. C. 4) K. oxytoca 106

Résumé 107

Chapitre 10. Corrélation entre sérologie et espèces biochimiques 108

10. A) Différences entre K. aerogenes et K. species 109

10. B) Différence entre K. aerogenes et K. oxytoca 111

10. C) Différences entre K. species et K. oxytoca 112

Résumé 113

Chapitre 11. Conclusions 114

Résumé et conclusion finale 117

Bibliographie 118

# INTRODUCTION

Les bactéries appartenant aujourd'hui au genre Klebsiella ont été observées pour la première fois par Klebs en 1880. Friedlander les observera en 1882 dans les expectorations des malades souffrant de pneumonie. Le nom de Klebsiella a été employé pour la première fois par Trevisan en 1888. Kitasato en 1889 différencie Klebsiella d'Escherichia coli. Trevisan (1888) avait distingué deux espèces du genre Klebsiella:

1) Klebsiella pneumoniae et
2) Klebsiella rhinoscleromatis.

Bergey, en 1925, mentionne pour la première fois K. ozenae, puis oxytoca sous le nom d'Aerobacter oxytocus. Ørskov 1955 emploie pour la première fois la dénomination Klebsiella aerogenes. Lautrop en 1956 classe Aerobacter oxytocus dans le genre Klebsiella. Cowan, Steel, Shaw et Duguid en 1960 décrivent Klebsiella edwardsii et Klebsiella atlantae. Bascomb, Lapage, Willcox et Curtis décrivent en 1971 un groupe nouveau ("unnamed").

Nous avons entrepris ce travail expérimental sur Klebsiella principalement parce que le rôle de cette bactérie est devenu de plus en plus important, surtout en milieu hospitalier (ØRSKOV, 1954, STEINHAUER, EICKHOFF, KISLAK and FINLAND, 1966, LE BOUAR, 1972). Le genre Klebsiella fait partie de la flore commensale de l'homme mais il est devenu un pathogène opportuniste. Le genre Klebsiella est encapsulé en général. Il existe plus de 72 types antinéniques capsulaires (KAUFFMANN, 1969, EDWARDS and EWING, 1972). Certains types capsulaires de Klebsiella se sont implantés dans les hôpitaux (STEINHAUER, EICKHOFF, KISLAK and FINLAND, 1966). Un malade peut donc contracter une infection hospitalière spontanément ou par voie isatrogène (sondes urinaires, cathéters, etc.). Ceci a été observé dans divers services chirurgicaux à Copenhague (ØRSKOV, 1954). L'usage massif des antibiotiques sélectionne les bactéries résistantes qui vont donc constituer un danger potentiel.

En outre dans certains hôpitaux Klebsiella est considérée comme la principale source de facteurs de la résistance infectieuse aux antibiotiques due à des plasmides (RTF) transférables à d'autres micro-organismes. (NESTER, EVANS, ROBERTS, Mc CARTHY, and PEARSALL, 1973). Cette constatation donne un intérêt croissant au rôle actuel de la Klebsiella du point de vue clinique et épidémiologique.

Dans la partie expérimentale du travail, nous avons étudié la distribution des sérotypes de Klebsiella dans les services du CHUV ainsi que l'activité de la phosphatase acide dans une centaine de souches. Depuis plusieurs années, cet enzyme est un des éléments de l'appréciation de la virulence chez Staphylococcus aureus. Nous l'avons détectée et mesuré chez Klebsiella puis nous avons mis en relation son niveau d'activité avec la sévérité des maladies que chaque souche à causée.

A la suite des travaux de STEINHAUER et al. (1966), nous avons ainsi étudié le rôle possible de certains types capsulaires de Klebsiella dans les infections nosocomiacales.

Nous avons donc tenté une étude épidémiologique de Klebsiella dans l'ensemble hospitalier du CHUV. (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois).

Nous remercions ici Mme Ida ØRSKOV qui a eu la gentillesse de nous typiser un certain nombre de souches.

# CHAPITRE 1
# TAXONOMIE

## 1.A) CARACTERES DES ENTEROBACTERIACEAE

Le genre Klebsiella appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Cette famille est formée de plusieurs genres qui ont des caractères communs.

Les Enterobacteriaceae se définissent comme

1) des bactéries Gram- en forme de bâtonnets.
2) des bactéries à métabolisme aérobie ou anaérobie facultatif; elles peuvent donc se multiplier en présence ou en absence d'oxygène.
3) capables d'attaquer le glucose avec ou sans production de gaz
4) possédant la catalase
5) dépourvues de cytochrome-oxydase démontrable au moyen de la N-diméthyl-paraphénylène-diamine (STANIER, DOUDOROFF and ADELBERG 1970)
6) capable de réduire les nitrates à nitrites (LE MINOR, 1972, Comité international de nomenclature bactériologique).

1.B) Dans la 8ème édition du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (1974) les Enterobacteriaceae sont classées à la 8ème partie sous le titre "Bâtonnets Gram négatifs anaérobies facultatifs".

Elles se subdivisent en 5 tribus:

Tribu I Escherichiae
Tribu II Klebsielleae
Tribu III Proteae
Tribu IV Yersinieae
Tribu V Erwinieae

## 1.C) LES KLEBSIELLEAE

La tribu des Klebsielleae se subdivise en genres:

a) Klebsiella

b) Enterobacter

c) Serratia

Ces genres diffèrent entre autres par la mobilité: Klebsiella est immobile tandis que les deux autres genres sont en général mobiles (EDWARDS and EWING, 1972).

## 1.D) LE GENRE KLEBSIELLA

Klebsiella, selon certains de leurs caractères biochimiques tels que la réaction de Voges-Proskauer , le virage du rouge de méthyle, la production d'indole et la fermentation du dulcitol se subdivise en espèces comme:

1) Klebsiella aerogenes (ØRSKOV, 1955)
2) Klebsiella innominata (unnamed group de BASCOMB, LAPAGE, WILLCOX and CURTIS, 1971)
3) Klebsiella oxytoca (LAUTROP, 1956)
4) Klebsiella pneumoniae (TREVISAN, 1888)
5) Klebsiella edwardsii (COWAN, STEEL, SHAW and DUGUID, 1960)
6) Klebsiella atlantae (COWAN, STEEL, SHAW and DUGUID, 1960)
7) Klebsiella ozenae (BERGEY, 1965)
8) Klebsiella rhinoscleromatis (TREVISAN 1888)

Les six premières espèces fermentent le lactose, Klebsiella ozenae et Klebsiella rhinoscleromatis en général le fermentent tardivement ou ne le fermentent pas.

## 1.E) DEFINITION BIOCHIMIQUE DU GENRE KLEBSIELLA

(Selon le Comité international de nomenclature bactériologique 1963).

Le groupe Klebsiella (genre) est formé par des bactéries immobiles et encapsulées conformes à la définition de la famille Enterobacteriaceae et qui présentent les caractères suivants:

### 1.E.1) Fermentations

| | |
|---|---|
| Gaz à partir du glucose | positive |
| Lactose | positive |
| Sucrose | positive |
| Mannitol | positive |
| Salicine | positive |
| Dulcitol | réactions variées |
| Adonitol (avec gaz) | positive |
| Inositol (avec gaz) | positive |
| Glycérol (avec gaz) | positive |
| Cellobiose (avec gaz) | positive |

### 1.E.2) Epreuves diverses

| | |
|---|---|
| Indole | négative |
| Rouge de méthyl | négative |
| Voges-Proskauer | positive |
| Citrate d'ammonium (source de C) | positive |
| Hydrogène sulfuré | négative |
| Uréase | positive (lente) |
| Croissance en milieu KCN | positive |
| Phénulalanine déaminase | négative |
| Malonate de Na | positive |
| Lysine décarboxylase | positive |

| | |
|---|---|
| Arginine dithydrolase | négative |
| Ornithine décarboxylase | négative |

(COWAN 1963)
(COWAN, STEEL, SHAW, and DUGUID 1960) (COWAN and STEEL 1974).

## 1.F) CARACTERES FERMENTATIFS DE KLEBSIELLA

Les fermentations de Klebsiella se distinguent des fermentations des autres Enterobacteriaceae. Tandis que Escherichia coli produit une grande quantité d'acides organiques, (fermentation à acide mixte, produisant du formate, de l'acétate du lactate et du succinate ce qui fait virer l'indicateur rouge de méthyl, BARRIT 1936), Klebsiella produit une quantité importante de substance neutres comme le 2,3 butanediol et l'alcool éthylique (SENEZ 1968). La réaction de Voges Proskauer est souvent positive et la réaction au rouge de méthyl, souvent négative (COWAN and STEEL, 1974).

### 1.F.1) Réaction de Voges Proskauer

Le 2,3 butanediol et l'alcool éthylique sont formés à partir du pyruvate, produit du catabolisme fermentatif du glucose. Plus précisément, deux molécules de pyruvate sont condensées par une enzyme stéréo-spécifique qui contient de la cocarboxylase qui, en présence d'ions Mn ++, forme l'acéto-lactate qui est décarboxylé ensuite en acétoïne par un autre enzyme et finalement réduit en butanediol par une déshydrogenase qui contient du NADH (SENEZ 1968).

Cette activité enzymatique bactérienne a une acidité voisine de 6,3 pH. Avec la réaction de Voges-Proskauer on détecte la présence d'un complexe entre les composés guanidiniques de la peptone du milieu et le diacétyle qui est le produit de l'oxydation

spontanée de l'acétoïne. La formule du diacétyle est la suivante: $CH_3$ - CO - Co - $CH_3$. Un complexe de couleur rose se forme après adjonction de a-naphtol et de KOH.

1. F. 2) Réaction du rouge de méthyl

Certaines Enterobacteriaceae comme Escherichia coli ainsi que K. atlantae, K. ozenae et K. rhinoscleromatis font virer le rouge de méthyl en milieu glucosé. Ceci signifie que la fermentation du glucose produit des substances acides (formate acétate, lactate et succinate) (SOKATZ 1969); la fermentation acidifie le milieu de telle façon que l'indicateur rouge de méthyle, vire au rouge.

1. F. 3) Réaction de la tryptophanase et production d'indole

Cette réaction caractérise Klebsiella oxytoca. Un enzyme, la tryptophanase, qui contient du phosphate de pyridoxal comme coenzyme dégrade le tryptophane en indole $NH_3$ et acide pyruvique en proportions équivalents 1 : 1 : 1. Cette tryptophanase est induite par le tryptophane (THIMANN 1963).

# CHAPITRE 2
# ANTIGENES DE KLEBSIELLA ET DEFINITION DES SEROTYPES

## 2.A) LES ANTIGENES DE KLEBSIELLA

Le genre Klebsiella est caractérisé par trois antigènes:

a) l'antigène capsulaire K

b) l'antigène somatique "lisse " O

c) l'antigène somatique "rugueux " R

Parmi ces trois antigènes, l'antigène K est d'une importance décisive pour l'étude épidémiologique des infections à Klebsiella. (EDWARDS and EWING, 1972).

Kauffmann considère qu'une quatrième substance, l'enveloppe mucoïde, caractérise, avec les trois antigènes cités, le genre Klebsiella.

Cependant, cette substance est liée à l'antigène capsulaire K. On peut donc distinguer, parmi les colonies de Klebsiella, les formes mucoïdes et non mucoïdes. Ces deux catégories sont lisses ou rugueuses selon qu'elles contiennent ou non l'antigène somatique O. Les formes capsulaires lisses ou rugueuses (avec ou sans antigènes O) sont les suivantes:

1) MKO Mucoïde, capsulaire avec antigène O (forme lisse)
2) MKR Mucoïde, capsulaire sans antigène O (forme rugueuse)
3) KO Non mucoïde, capsulaire avec antigène O (forme lisse)
4) KR Non mucoïde, capsulaire sans antigène O (forme rugueuse) (KAUFMANN, 1969).

Les formes lisses, types coloniaux 1) et 3) du groupe ci-dessus sont virulentes pour la souris; les formes rugueuses ne le sont jamais. Les formes acapsulaires lisses ou rugueuses (avec ou sans antigène O) sont les suivantes:

1) MO Mucoïde, acapsulaire, avec antigène O (forme lisse)
2) MR Mucoïde, acapsulaire, sans antigène O (forme rugueuse)
3) O Non mucoïde, acapsulaire, avec antigène O (forme lisse)
4) R Non mucoïde, acapsulaire, sans antigène O (forme rugueuse) (KAUFMANN, 1969).

Ces deux classifications prennent en considération les faits suivants:

a) Il existe des formes capsulaires non mucoïdes (formes 3 et 4 du premier groupe)

b) Il existe des formes acapsulaires mucoïdes (formes 1 et 2 du second groupe)

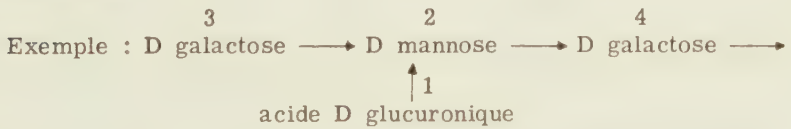
Il faut noter que l'antigène R est présent dans toutes les formes (KAUFMANN, 1965), mais cette présence n'est pas détectée avec des essais d'agglutination quand les cellules de Klebsiella ont un antigène O, normal et abondant.

## 2. B) STRUCTURE DU POLYSACCHARIDE CAPSULAIRE

Les principaux caractères de polysaccharide de la capsule sont les suivants.

a) Le polysaccharide est composé par des unités de tétrasaccharide qui se répètent. Ces sus-unités forment un ensemble complexe de polymères, les exopolasaccharides capsulaires.

b) Chaque tétrasaccharide (unité répétitive) est composée par trois sucres neutres et un sucre chargé négativement; l'acide glucuronique.




c) Chaque tétrasaccharide est composé d'une structure linéaire trisaccharidique et d'un seul résidu mono saccharidique ramifié.

d) Les résidus galactose sont liés par l'intermédiaire du 3ème atome de carbone (C3). Les résidus du mannose sont liés par l'intermédiaire du $C_2$ et $C_3$ et ceux de l'acide glucuronique à des positions terminales non réduites (YUREWTCH E. et al. (1971). ERIKSEN (1968).

e) L'infection de Klebsiella par certain bactériophages virulents est suivie de la dépolymérisation de polysaccharide capsulaire (SUTHERLAND 1972).

Par exemple, la capsule du type 2 de Klebsiella aerogenes est constituée, entre autres, de groupes formyles, associés ou a d'autres résidus, de telle sorte qu'on trouve les trois constitutions suivantes:

1) Les oligosaccharides contenant des groupes formyles
2) ceux qui contiennent des groupes formyles et des groupes pyruvyles.
3) ceux qui contiennent des groupes formyles et des groupes acétyles.

Ces groupes sont situés dans les tétramériques de façon:

1) uniforme ou
2) alternative

f) Chaque type capsulaire de Klebsiella a une composition du tétramérique qui lui est propre (SUTHERLAND, 1972) (voir tableau no 1).

TABLEAU 1

RESIDUS DE SUCRES TROUVES DANS LES EXOPOLYSACCHARIDES DE KLEBSIELLA

| TYPE capsulaire | Monosaccharides | Références |
|---|---|---|
| 1 | Fucose, glucose, acide glucuronique | BARKER et al. (1963) |
| 2 | Mannose, glucose, acide glucuronique | GAHAN et al. (1967) |
| 3 | Mannose, galactose, acide galacturonique | HENRIKSEN and ERIKSEN (1962) |
| 4 | Mannose, galactose, glucose, acide uronique | ERIKSEN (1962) |
| 5 | Mannose, galactose, glucose, acide uronique | HENRIKSEN et al. (1961) |
| 8 | Galactose, glucose, acide glucuronique | DUDMAN and WILKINSON (1956) |
| 9 | Rhamnose, galactose, acide glucuronique | HEIDELBERGER et al. (1970) |
| 11 | Mannose, galactose, glucose, acide glucuronique | NIMMICH (1969); ERIKSEN and HENRIKSEN (1963) |
| 21 | Mannose, galactose, acide uronique | ERIKSEN and HENRIKSEN (1963) |
| 23 | Rhamnose, glucose, acide glucuronique | NIMMICH (1969) |
| 26 | Mannose, galactose, glucose, acide uronique | DUDMAN and WILKINSON (1956) |
| 29 | Mannose, galactose, acide uronique | DUDMAN and WILKINSON (1956) |
| 30 | Mannose, galactose, glucose, acide uronique | I. W. SUTHERLAND |
| 32 | Rhamnose, galactose | HEIDELBERGER et al. (1970) |
| 45 | Rhamnose, glucose, acide glucuronique | NIMMICH (1969) |
| 47 | Rhamnose, galactose, acide glucuronique | HEIDELBERGER et al. (1970) |
| 52 | Rhamnose, galactose, acide glucuronique | HEIDELBERGER et al. (1970) |

| TYPE capsulaire | Monose | Références |
|---|---|---|
| 54 | Fucose, glucose, acide glucuronique | DUDMAN and WILKINSON (1956) |
| 57 | Mannose, galactose acide uronique | DUDMAN and WILKINSON (1956) |
| 61 | Galactose, glucose, acide glucuronique | NIMMICH (1969) |
| 64 | Rhamnose, mannose glucose, acide glucuronique | I. W. SUTHERLAND |
| 71 | Rhamnose, glucose, acide glucuronique | NIMMICH (1969) |
| 72 | Rhamnose, glucose, acide glucuronique | NIMMICH (1969) |

## 2. C) ANTIGENE O

L'antigène somatique "lisse" O est de nature polysaccharidique. La détermination de cet antigène est effectuée à partir des cultures acapsulées. L'antigène O est préparé à partir d'une culture bactérienne prélevée sur milieu agarisé et formolé, mise en suspension.

La préparation des cultures acapsulées est difficile; on peut obtenir de telles cultures par repiquages successifs dans du bouillon contenant 50 % de bile (KAUFFMANN, 1949). Plusieurs souches de Klebsiella ne présentent pas d'antigène O, parce que ces dernières sont sous la forme R.

L'étude des antigènes O de Klebsiella présente un intérêt épidémiologique limité; leur importance pratique est négligeable (EDWARDS and EWING, 1972). Cinq groupes d'antigènes O ont été découverts jusqu'à aujourd'hui, ainsi qu'un groupe R.

La détermination du groupe O 1 s'effectue à partir de cultures mucoïdes, acapsulaires, avec antigène O (forme lisse ou avec des cultures non mucoïdes, acapsulaires, avec antigène O (forme lisse), en utilisant l'antisérum 19a et 19b d'Escherichia coli.

L'analyse de l'antigène O du groupe 2 est plus difficile que celle de l'antigène du groupe 1; ce groupe est subdivisé en deux sous-groupes 2A et 2B; chacun de ces deux sous-groupes est divisé en deux parties, selon le schéma suivant:

Groupe 2A = 2a
Groupe 2A = 2a, 2b
Groupe 2B = 2a, 2c
Groupe 2B = (2a) 2c, 2d

Les différence entre les sous-groupes ne sont pas toujours claires avec les tests d'agglutination, parce que certains séra donnent de fortes réactions croisées.

Le sérum du groupe 2A qui possède l'agglutinine 2a est absorbé complètement par une souche du groupe 2B ayant la composition 2a 2c mais n'agglutine pas avec une souche (2a) 2c 2d l'antigène 2a étant incomplet.
L'antigène 2a est dominant dans le groupe 2A et l'antigène 2c est dominant dans le groupe 2B (KAUFFMANN, 1949).

Dans le tableau suivant, l'inter-dépendance des cinq groupes O avec les soixante-douze types capsulaires est présentée.

TABLEAU 2

| Groupe O | Type capsulaire |
|---|---|
| 1 | 1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 29, 30, 32, 34, 37, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 62. |
| 2 | 2, 3, 4, 5, 6, 8, 27, 28, 35, 42, 39. |
| 3 | 11, 25, 31, 33, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 58. |
| 4 | 15, 42. |
| 5 | 57, 61. |
| R (et non classées) | 9, 13, 14, 17, 18, 36, 38, 40, 52, 56, 60, 63, 72. |

## 2. D) ANTIGENE M ET SUBSTANCE VISQUEUSE ("SLIME")

Henriksen (1954) a démontré la présence d'un antigène M de la substance visqueuse (slime) qui ressemble à l'antigène capsulaire, mais qui n'est pas identique à celui-ci. Cet antigène caractérise les cultures ayant une capsule ou qui sont acapsulées. L'antigène M des cultures de Klebsiella est soit organisé en capsules, soit présent sous une forme non organisée, la substance visqueuse (slime HENRIKSEN, 1954).

Ce même antigène M présente des réactions croisées avec des souches de E. coli qui possèdent l'antigène M.

RESUME

Klebsiella est une bactérie Gram négative sous forme de bâtonnets, qui présente tous les caractères des Enterobacteriaceae. Elle est toujours immobile et ne possède pas l'enzyme ornithine décarboxylase; elle peut utiliser en général le citrate et le malonate comme seule source de carbone; elle a une capsule et ses cultures sont souvent muqueuses.

# CHAPITRE 3
# INFECTIONS A KLEBSIELLA

## 3. A) GENERALITES

La pneumonie à Klebsiella est due principalement à des souches appartenant au type capsulaire I. Klebsiella provoque des infections suppuratives des voies respiratoires hautes. Elle est responsable aussi des infections bilaires, intestinales, génitales et urinaires. Les infections urinaires sont très fréquentes: 2/3 des infections à Klebsiella concernant les voies urinaires. Klebsiella est aussi à l'origine de méningites, de septicémies, de pyémies, de pleurésies, de néphrites, de pyélites, d'ostéomyélites et de thrombophlébites.
Une manifestation grave de l'infection est le choc septique. (CAPET R., (1970), LO. D., (1971).

Les infections à Klebsiella, comme les infections dues à Pseudomonas aeruginosa et à Proteus sont en voie d'extension à cause des phénomènes de substitution de la flore intestinale après traitement par les antibiotiques.

## 3. B) PNEUMONIE

La pneumonie primaire, due à Klebsiella, est plus fréquente entre 40 et 60 ans. L'homme est atteint plus fréquemment que la femme. La pneumonie à Klebsiella est favorisée par des facteurs tels que l'alcoolisme chronique, la malnutrition, le mauvais état général. Certains types capsulaires de Klebsiella sont responsables de ces infections.

### 3. B. 1) Anatomie pathologique

Le poumon est lourd et volumineux. On observe une consolidation massive d'un ou de plusieurs lobe. La partie centrale des régions lésées présente une nécrose des septae alvéolaires et des dépôts

de fibrine à la périphérie. Dans les bronches lésées, on trouve des polynucléaires en grande quantité et aussi de grandes monoculéaires (cellules épithéliales et monocytes), des érythrocytes et un nombre très important de bactéries capsulées. Les alvéoles, souvent liquéfiées, présentent un exsudat plein de mucus. La formation d'absès est très fréquente. (WOOD, 1967), (THALER, 1962).

3. B. 2) Complications

La pleurésie, l'empyème, la méningite, la péricardite et l'arthrite sont parmi les complications les plus fréquentes de la pneumonie à Klebsiella.
Cette maladie a des tendances à évoluer, d'une part vers la chronicité et d'autre part vers des exacerbations qui prennent l'allure d'une forme aigüe, à noter la possibilité d'une évolution fatale (dans 40 % des cas traités). L'évolution vers la chronicité est caractérisée par des supurations et des nécroses (WOOD, 1967).

3. B. 3) Diagnostic

Chaque pneumonie aigüe avec prostration, signes stéthacoustiques faibles et données radiologiques importantes (signes de consolidation massive avec atteinte des lobes supérieurs), peut-être due à Klebsiella. La présence de crachats hémorragiques est en faveur du diagnostic, lequel se confirme par l'examen bactériologique.

3. B. 4) Principaux signes différentiels entre pneumonie à Klebsiella et pneumonie à pneumocoques

Le diagnostic différentiel entre pneumonie à Klebsiella et pneumonie à pneumococcus est basé sur les éléments suivants.

| PNEUMONIE A KLEBSIELLA | PNEUMONIE A PNEUMOCOQUES |
|---|---|
| WOOD W. B., (1967) | |
| maladie surtout du mâle | maladie des deux sexes |
| maladie surtout de l'alcoolique et de l'individu en mauvais état général. | maladie de tous les âges (mais morbide) |
| maladie à évolution foudroyante | maladie à évolution lente |
| expectoration difficile | |
| crachats hémorragiques | crachats rouillés |
| signes stéthacoustiques faibles | signes stéthacoustiques nets (vibrations vocales intenses, râles sous crépitants et consonnants, zones de submatité) |
| consolidation massive aux aux rayons X | à côté de l'opacité, présence relativement fréquents d'un "voile pleural" |
| atteinte des lobes supérieurs | atteinte des bases des deux poumons |
| pas de réaction macrophagique connue | réaction macrophagique |
| Herpès très rare | Herpès labialis dans 5-40 % des cas |
| leucopénie fréquente dans plus d'un tiers des cas (la leucocytose est un signe de complication purulente) | leucocytose (15. 000-40. 000 leucocytes par $ml^3$) pendant la phase aigüe. |
| tendance à la chronicité | tendance à la chronicité peu |

| PNEUMONIE A KLEBSIELLA | PNEUMONIE A PNEUMOCOQUES |
|---|---|
| WOOD W. B., (1967) | |
| suppuration pulmonaire fréquente | la résolution est complète et marquée par conséquent, il n'y a plus de suppuration. |
| pas de zone d'hépatisation | zone d'hépatisation rouge et grise |
| nécrose fréquente | nécrose rare (malgré l'intensité de l'inflammation) |
| la pénicilline est inefficace | la pénicilline est efficace |

3. B. 5) Etapes physiopathologiques de l'action de l'endotoxine pendant le choc septique à Klebsiella

A. Etape locale

L'action primaire de l'endotoxine de Klebsiella s'excerce sur les petits capillaires avec innervation sympathique (du type a-récepteur). Un spasme artériolaire et veineux suit; le sang s'immobilise principalement dans les capillaires pulmonaires et rénaux. Ensuite, on observe une anoxie et une acidose locales. L'acidose et l'anoxie provoquent une constriction des veinules et une relaxation des artérioles; ceci conduit à une hypotension artérielle.

B. Etape avec des signes généraux

Des signes généraux apparaissent:

1) Fièvre. Elle est causée par le liposaccharide de l'endotoxine, qui libère une substance pyrogène à partir des polynucléaires.
2) Signes digestifs (diarrhées).
3) Signes cardio-vasculaires (tachycardie et hypotension).
4) Les extrémités sont froides.

5) Signes nerveux: torpeur.

6) Oligurie: la persistance de l'oligurie amène une insuffisance respiratoire et le coma (PETERSDORF R., 1970).

## 3.C) INFECTION URINAIRE

L'infection urinaire à Klebsiella se distingue de l'infection à E. coli par sa faible réponse immunologique produisant un taux d'agglutinines bas et le caractère chronique de l'infection (SANFORD et al., 1965). Le taux des agglutinines circulantes est cependant un facteur déterminant aussi bien de l'infection à Klebsiella que de la réinfection. Après réinfection homotypique, on observe un manque de résistance. Le rat montre une incapacité de réponse immunologique envers l'antigène capsulaire de Klebsiella. Ceci peut expliquer la réinfection. (SANFORD, BEESON et al., 1965).

### Tableau clinique

Fièvre sous forme de poussées qui peuvent atteindre 40 % et qui sont accompagnées de frissons caractérisant cette infection, en association avec des douleurs lombaires et des signes de cystite (pollakiurie, sensation de brûlure pendant la miction et douleur terminale. Les urines troubles (pyurie fréquente), parfois colorées de sang et, dans le sédiment, on trouve des cylindres granuleux et hyalins, ainsi que des hematies et du pus. La concentration des bactéries permet d'apprécier la gravité de l'infection, qui en dépend.

## 3.D) OZENE

L'ozène est une rhinite (inflammation de la muqueuse et de la sous-muqueuse nasale) atrophique. Le squelette peut être atteint. Des croûtes d'une odeur fétide se forment. L'intensité de l'odeur est très grande et ressemble à l'odeur de punaise écrasée. Cette maladie est plus fréquent pendant l'adolescence.

Les sécrétions nasales sont diminuées et par conséquent, la muqueuse se dessèche. Les croûtes deviennent très grandes et purulentes; si on les enlève, le nez ne saigne pas. Une anosmie s'installe et la respiration par le nez devient impossible (BARRAUD, MONTANDON, NAGER, RUEDI, SCHLITTLER, TAILLENS, 1952).

### 3. E) RHINOSCLEROME

Le rhinosclérome est une infection inflammatoire d'évolution lente, insidieuse et souvent silencieuse pendant des années. Il débute par un corysa avec tableau clinique léger. Ensuite, une atrophie légère s'installe progressivement et des croûtes se forment d'une odeur absolument insupportable (plus insupportable encore que celle de l'ozène). Des épistaxis surviennent, ainsi que'une formation de modules très durs et saignant très facilement. Il y a un rétrécissement des choanes nasales et des cicatrices se forment. La maladie évolue topographiquement vers le larynx. (BARRAUD, MONTANDON, NAGER, RUEDI, SCHLITTLER et TAILLENS, 1952).

### 3. F) BACTERIEMIE (SEPTICEMIE) A KLEBSIELLA CHEZ LES CANCEREUX

Récemment des études ont été faites aux Etats-Unis sur le rôle de Klebsiella comme cause d'infection fatale chez les malades atteints de cancer. (UMSAWASDI, MIDDLEMAN, LUNA and BODEY, 1973). Des malades ayant eu des hémocultures positives pendant une seule poussée de fièvre sont considérés comme des malades ayant présenté une bactériémie; ceux qui ont eu des hémocultures positives pendant deux poussées de fièvre à des intervalles de temps considérables sont considérés comme ayant fait deux infections. Ces auteurs ont étudié 152 cas de bactériémie à Klebsiella parmi 137 patients d'un âge moyen de 46 ans.

Parmi ces patients, 99 étaient leucémiques, 54 carcinomateux et 9 souffraient d'un lymphome ou d'un myélome multiple.

Divers facteurs semblaient avoir favorisé le développement d'une bactériémie à Klebsiella: 50 % des malades avaient un nombre de polynucléaires neutrophiles inférieur à 100/$mm^3$; 67 % des malades avaient reçu des antibiotiques avant le début de la bactériémie (64 malades parmi les 137 avaient reçu de la carbenicilline 49 de la céphalotine, 25 de la gentamycine, 18 de l'ampicilline, 13 de la kanamycine et 12 du chloramphénicol, 67 % des malades avaient reçu une chimiothérapie anticancéreuse pendant deux semaines avant le début de la bactériémie (50 % avaient reçu des corticoides). 20 malades avaient subi un traitement chirurgical et 9 parmi eux ont présenté une bactériémie comme complication de l'intervention chirurgicale.

Un nombre important de malades avaient présenté une autre bactériémie avant l'établissement de celle due à Klebsiella.

L'origine de cette bactériémie a été trouvée dans 130 cas. Le poumon était le foyer d'origine le plus fréquent. Les patients qui présentaient un foyer d'origine génito-urinaire répondaient d'une façon plus favorable au traitement par les antibiotiques. On peut en tirer une conclusion importante: lorsque le nombre de neutrophiles dans le sang est supérieur à 1'000/$mm^3$, les malades réagissent plus rapidement aux antibiotiques que si ce nombre est inférieur à 1'000/$mm^3$.

Un traitement rapide aux antibiotiques est conseillé pour les patients neutropéniques (UMSAWASDI, MIDDLEMAN, LUNA and BODEY, 1973).

## 3. G) ROLE ET IMPORTANCE ACTUELLE DE L'INFECTION A KLEBSIELLA

Au cours de ces dernières années une recrudescence des infections hospitalières provoquées par Klebsiella a été observée. Malgré les mesures préventives souvent très minutieuses prises dans l'ensemble hospitalier ni l'éradication ni la prévention de ces infections n'a pu être obtenue entièrement. Dernièrement des états septicémiques, secondaires à des perfusions ont été observés à Paris. Des bactéries présentes à la pharmacie d'un hôpital sur les bouchons des flacons de perfusion ont infecté un certain nombre de malades déjà sous traitement (LE BOUAR, 1972).

RESUME

Klebsiella provoque diverses formes d'infections. La pneumonie causée par cette bactérie présente des signes stéthacoustiques faibles et une consolidation franche à l'examen radiologique; l'évolution de l'infection est souvent foudroyante. L'endotoxine de Klebsiella est responsable d'une forme maligne de l'infection, le choc septique. L'infection urinaire est une forme fréquente d'infection. Klebsiella est une bactérie qui prend de plus en plus d'importance en provoquant des états septicémiques chez les patients "compromis" comme les cancéreux.

# CHAPITRE 4

# RELATIONS ENTRE TAXONOMIE ET GRAVITE DE L'INFECTION

FORSTER et BRAGG ont étudié en 1962 50 cas de malades au Dudley Road Hospital (Etats-Unis) qui présentaient une infection respiratoire à Klebsiella. Ils ont réparti les cas en trois groupes selon la gravité de l'infection.

Groupe 1 Malades ayant présenté des pneumonies fatales avec formation d'abcès

Groupe 2 Malades souffrants d'une pneumonie avec des signes radiologiques de condensation pulmonaire.

Groupe 3 Malades souffrant de bronchite ou d'autres infections respiratoires sans signes radiologiques de condensation.

Les résultats de cette recherche sont présentés dans le tableau suivant:

TABLEAU 3

CORRELATION DE LA GRAVITE DE L'INFECTION ET DES ESPECES

| | No des souches | No des souches virulentes pour les souris | No des patients | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Groupe 1 | Groupe 2 | Groupe 3 |
| K. aerogenes | 31 | 2 | 3 | 13 | 15 |
| K. edwardsii | 8 | 5 | 6 | 2 | 0 |
| K. atlantae | 6 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| K. pneumoniae | 4 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| K. rhinoscleromatis | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Dans le travail cité, il est évident que:

1) K. edwardsii est responsable du plus grand nombre des pneumonies fatales.

2) K. aerogenes est la seule autre espèce avec K. edwardsii capable de produire des pneumonies fatales. Cependant, la virulence de cette bactérie est très variée.

3) K. atlantae est responsable de pneumonies et de bronchites.

4) K. pneumoniae est responsable des bronchites seulement.

5) K. rhinoscleromatis est responsable d'un cas de bronchite.

RESUME

La virulence de diverses espèces de Klebsiella est variable. K. edwardsii et K. atlantae sont des espèces virulentes. Par contre Klebsiella aerogenes comporte des souches virulentes et des souches avirulentes, cette variation est probablement due à la présence ou à l'absence des fimbriae (les souches non fimbriées étant virulentes, DUGUID, 1959).

# CHAPITRE 5
# TRAVAIL PERSONNEL
# MATERIEL ET METHODES
# POUR LES FERMENTATIONS
# ET LES EPREUVES BIOLOGIQUES

## 5.A.1) BUT DU TRAVAIL

Nous avons étudié 100 souches de Klebsiella provenant des laboratoires de diagnostic de l'Institut de Microbiologie de Lausanne qui les ont isolées de prélèvements des malades du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) et d'autres hôpitaux de la région de Lausanne.

Les buts de ce travail sont les suivants:

1) déterminer, par des tests biochimiques, les espèces du genre Klebsiella, parmi un échantillonage de 100 souches isolées à Lausanne.

2) déterminer les types capsulaires de Klebsiella en utilisant la technique du gonflement de la capsule.

3) comparer les données biochimiques et sérologiques.

4) étudier la distribution des espèces et des sérotypes de Klebsiella dans le Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)

5) déterminer l'activité de l'enzyme phosphatase acide et la relation du niveau d'activité de cet enzyme avec la virulence des souches.

6) étudier le comportement du genre et des espèces de Klebsiella vis-à-vis des antibiotiques.

## 5.A.2) ENSEMBLE DE CARACTERES ETUDIES

L'application de méthodes courantes aux déterminations d'espèces a été limité aux épreuves figurant au tableau 4.
Une épreuve biochimique peut être positive ( + ) ou négative ( - ). Pour une même espèce les résultats ne sont pas univoques, de telle sorte que l'on doit considérer la proportion des souches donnant des résultats positifs ( + ) ou négatifs ( - ). L'expression de ces résultats est donc contingente de ces proportions.

Cependant il est recommandé de se référer aux variations telles qu'elles figurent dans le tableau 4. Les réactions biochimiques (fermentations et autres épreuves biologiques) y sont résumées. Ces résultats sont basés sur la publication de COWAN, STEEL, SHAW et DUGUID (1960). Nous ne possédons pas les pourcentages pour K. innominata.

## 5. A. 3) MATERIEL ET METHODES

Nous avons étudié les caractères biochimiques selon les méthodes suivantes:

Méthodes utilisées pour les fermentations et les épreuves biologiques:

La catalase a été démontrée selon la technique de THOMAS (1963), l'oxydase, selon la technique de KOVACS (1956). La fermentation des hydrates de carbone a été étudiée selon PICKETT et NELSON (1955). Les fermentations du glucose et du lactose ont aussi été étudiées dans le milieu de KLIGLER (1917). La mobilité et la production d'$H_2S$ ont été étudiées selon la méthode de GREENE, BLUM, de CORA, FARCHILD, KAPLAN, LANDAU, et SHARP (1951).[1)]
L'ornithine décarboxylase et la lysine décarboxylase ont été recherchées selon la méthode de TAYLOR (1965). La phénylalanine déaminase selon SHAW et CLARK (1955). La consommation de citrate a été déterminée sur le milieu de SIMMON'S (1926). Pour celle du Malonate, le milieu de SHAW et CLARK (1955). La réaction de Voges Proskauer selon BARRIT (1926) utilise le même milieu que la réaction du rouge de méthyl. L'indole a été recherché dans le milieu de GREENE, BLUM, de CORA, FAIRCHILD, KAPLAN, LANDAU et SHARP (1951)[1)] au

1) Voir SOCIETY OF AMERICAN MICROBIOLOGISTS
Manual of Microbiological Methods (1957)

moyen du réactif d'Erlich (BHOME 1905). L'urée a été recherchée selon la méthode de STUART, VAN STRATUM et RUSTIGIAN (1945).

TABLEAU 4 KLEBSIELLA CARACTERES COMMUNS DU GENRE: a) Morphologie: Bâtonnet Gram - , b) Mobilité - , c) Caractères biochimiques: Catalase + , Oxydase - , Ornithine déc. - , Phénylalanine déam. - $H_2S$ - , d) Caractères fermentatifs: Glucose + , Adonitol + , Inositol + Sorbitol + Mannitol + .

| Caractères différentiels. | K. aerogenes | | K. innominata | | K. oxytoca | | K. pneumoniae | | K. edwardsii | | K. atlantae | | K. ozenae | | K. rhinoscleromatis. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1) | % | 2) | % | 3) | % | 1) | % | 1) | % | 1) | % | 1) | % | 1) | % |
| Citrate | + | 100 | - | | + | 85-100 | + | 100 | d | 71 | + | 100 | d | 70 | - | |
| Malonate | + | 94 | + | | | | + | 100 | d | 43 | - | 0 | - | 0 | + | 100 |
| Voges-Proskauer | + | 99 | d | | + | 85-100 | - | 0 | + | 100 | d | 40 | - | 0 | - | 0 |
| Rouge méthyl | - | 10 | d | | - | 0-15 | + | 100 | d | 28 | + | 100 | + | 100 | + | 100 |
| Indole | 3) - | | - | | + | 100- | - | | - | | - | | - | | - | |
| Urée | + | 97 | - | | + | 85-100 | + | 100 | + | 100 | + | 100 | 3) | 40 | - | 0 |
| Dulcitol | d | 31 | - | | + | 85-100 | + | 100 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| Lactose | + | 100 | + | | + | 85-100 | + | 100 | + | | + | 100 | (+) | +90*10 | - | 0 |
| Lysine déc | + | 98 | d | | + | 85-100 | + | 100 | + | 100 | + | 100 | - | +15*3 | - | 0 |

Légende: 1) Cowan, Steel Shaw and Duguid (1960).
2) Bascomb, Lapage, Willcox and Curtis (1971).
3) Cowan and Steel (1974).

+, réactions positives à 85 - 100 %
-, réactions positives à 0 - 15 %
d, réactions positives de 16 à 84 % (en général autour de 50 %.)
*, réactions positives tardivement (2 à 3 jours.)

TABLEAU 5

FERMENTATIONS ET EPREUVES BIOLOGIQUES DU GENRE KLEBSIELLA

| | % et Nombre de souches | | |
|---|---|---|---|
| Catalase | 100 | Citrate | 96 |
| Oxydase | 0 | Malonate | 94 |
| Mobilité | 0 | Voges Proskauer | 61 |
| Glucose | 100 | Rouge méthyl | 13 |
| Adonitol | 94 | Indole | 17 |
| Inositol | 94 | Urée | 84 |
| Sorbitol | 98 | Dulcitol | 34 |
| Mannite | 99 | Lactose | 100 |
| Ornithine décarboxylase | 0 | Lysine décarboxylase | 96 |
| Phenylalanine déam. | 0 | | |
| $H_2S$ | 0 | | |

TABLEAU 6 EPREUVES BIOLOGIQUES ET FERMENTATIONS DES ESPECES DE KLEBSIELLA

| | Nombre de souches | Adonitol | Inositol | Sorbitol | Citrate | Malonate | Voges Proskauer | Rouge méthyl | Indole | Urée | Dulcitol | Lysine déc |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K. aerogenes | 48 | 44 | 45 | 47 | 46 | 44 | 48 | 0 | 0 | 41 | 14 | 47 |
| K. species | 26 | 25 | 24 | 26 | 25 | 25 | 0 | 0 | 0 | 22 | 7 | 23 |
| K. oxytoca | 17 | 16 | 17 | 17 | 17 | 17 | 10 | 5 | 17 | 14 | 13 | 17 |
| K. edwardsii | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0 | 3 |
| K. atlantae | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| K. pneumoniae | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| K. ozenae | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |

Note: Les deux souches de K. ozenae étaient lactose +.
Il n'avait pas de souches lactose négatives parmi les souches étudiées et par conséquant nous avons supprimé le caractère "lactose" des caractères différentiels utilisés pour l'identification des espèces de Klebsiella.

5.A.4) RESULTATS DES EPREUVES BIOLOGIQUES ET DES FERMENTATIONS (taxonomie et origine des prélèvements) -

Les résultats des épreuves biologiques et des fermentations sont représentés au tableau 5.

Le tableau 6 indique les épreuves biologiques et fermentations, des espèces de Klebsiella.

Selon ces résultats nous avons subdivisé le genre Klebsiella en 8 espèces (tableau 4). D'après ce tableau sous la nomination K. species, nous avons classé un certain nombre de souches Voges-Proskauer négatives et rouge de méthyl négatives qui sont taxonomiquement proches des K. "unnamed group" (K. innominata) décrites par BASCOMB et al. (1971) et qui dévient moins des caractères du groupe Klebsiella (e.g. elles sont citrate + , tandis que le "unnamed group" K. innominata sont citrate - ).

Selon ce tableau les espèces les plus fréquentes sont K. aerogenes, K. species, K. oxytoca.

Etant donné la fréquence élevée de ces 3 espèces, nous suivrons dans ce travail leur propriétés biologiques et nous ferons le point sur les significations taxonomiques qui en découlent. Le tableau 7 démontre la distribution de l'origine des prélèvements, (expectorations, urines, prélèvements, plaie, frottis de gorge, sondes et selles).

TABLEAU 7 ORIGINE DES PRELEVEMENTS

| | Expectorations | Urines | Prélèvements plaie | Frottis gorge | Sondes | Selles |
|---|---|---|---|---|---|---|
| K. aerogenes | 8 | 29 | 6 | 0 | 3 | 2 |
| K. species | 3 | 14 | 2 | 0 | 6 | 1 |
| K. oxytoca | 5 | 6 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| K. edwardsii | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| K. atlantae | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| K. pneumoniae | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| K. ozenae | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |

# CHAPITRE 6
# SEROLOGIE

## 6.A.1) INTRODUCTION

La sérologie des Klebsiella étant un domaine de recherche très vaste (80 types capsulaires déjà identifiés et plusieurs types somatiques O), nous avons été amenés à travailler avec les types sérologiques les plus fréquemment rencontrés dans notre région. Après un triage préliminaire nous avons choisi les antiséra correspondant aux types capsulaires suivants: 1,2,3,4,5,6, 7,8,9,10,24,26 et 65 (ce dernier a été isolé initialement à partir d'un singe du jardin zoologique de Bâle).[1)]

Nous avons voulu par ce travail expérimental faire le point sur la situation épidémiologique de la région hospitalière de Lausanne (Canton de Vaud, Suisse).

## 6.A.2) MATERIEL ET METHODES POUR LA SEROLOGIE

6.A.2.a) Le milieu de base pour les études sérologiques est le milieu de Worfel-Ferguson.

Composition du milieu de Worfel-Ferguson

| | |
|---|---|
| NaCl | 2 g |
| Sulfate de potassium | 1 g |
| Sulfate de magnésium | 0,25 g |
| Saccharose | 2 g |
| Extrait de levure | 2 g |
| Agar | 15 g |
| $H_2O$ distillé | 1'000 ml |

Nous stérilisons à 120 °C. pendant 15 minutes.

6.A.2.b) Nous avons utilisé pour la préparation des antiséra, un vaccin séché à l'acétone (GREEN, PIGOTT, BOLIN and

1) Un certain nombre de souches ont été typisées par Ida Ørskov à Copenhague.

HARRELL, 1970). Les avantages de ce vaccin, en comparaison avec les vaccins préparés à l'alcool, sont les suivants: il n'est pas nécessaire de préparer un vaccin frais pour chaque nouvelle inoculation car il est très stable. Il peut aussi être utilisé comm antigène pour l'agglutination sur lame.

6.A.3) TECHNIQUE DE PREPARATION DE L'ANTIGENE
(selon GREEN J.H. et al. 1970)

Les cultures obtenues sur un milieu solide sont transférées sur géloses Worfel Ferguson et incubés pendant 18 - 24 h à 37 °C. Les clones capsulés (testés par la coloration de la capsule) sont transférées sur des géloses inclinées d'agar Worfel Ferguson. Après incubation de 18 - 24 heures à nouveau les cultures sont testées pour la présence des cellules encapsulées. La spécificité du type a été confirmé avec un antisérum homologue.

Ensuite, nous transférons le matériel récolté sur le milieu de Worfel Ferguson à 10 ml de solution salino-physiologique, puis inoculons 3 ml dans des boîtes de Petri de 14 cm contenant le milieu suivant:

| | |
|---|---|
| Tryptose Difco | 1,5 % |
| trypticase (BBL) | 1,5 % |
| extrait de levure | 0,3 % |
| agar | 3 % |

Après 24 heures à 37 °C. les cultures sont suspendues dans de l'eau formolée à 0,5 % et, à cette suspension, nous ajoutons un volume égal d'acétone. Les cellules sont centrifugées à 13.000 x g pdt 30 minutes et le surnageant est jeté. Le sédiment est lavé trois fois à l'acétone, puis résuspendu dans l'acétone en masse épaisse que l'on laisse sécher à l'air à température ambiante. Quand les cellules sont sèches, la masse est réduite en poudre fine dans un mortier stérile; celle-ci est conservée à température ambiante dans des tubes à fermeture étanc

Des lapins sont inoculés par voie intraveineuse avec des quantités précises de vaccin sec en suspension dans 1 ml de solution saline physiologique.

La quantité du vaccin donné par inoculation et le plan des inoculations est donné par le schéma suivant:

SCHEMA DE VACCINATION

| Jour d'inoculation | Quantité de vaccin par inoculation |
|---|---|
| 0 | 0,5 mg |
| 3 | 1,0 mg |
| 7 | 2,0 mg |
| 10 | 3,0 mg |
| 14 | 4,0 mg |
| 17 | 5,0 mg |

Nous avons récolté le sang au 20 ème jour, et décanté stérilement le sérum. Ce dernier a été conservé en flacon stérile à + 4 $^{o}$C. jusqu'à l'emploi pour les agglutinations et les épreuves de gonflement capsulaire.

6. A. 4) AGGLUTINATION

Nous préparons des suspensions de densité moyenne de l'antigène bactérien, à partir de cultures sur gélose de Worfel-Ferguson dans une solution saline formolée à 10 % (ØRSKOV I, communication personnelle, 1971). Ensuite, nous testons avec les antiséra, des types capsulaires 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 26, et 65 (ces 13 antiséra parmi les 72 connus, ont été choisis d'après les données épidémiologiques dans les autres pays). Chaque suspension est utilisée pour une agglutination sur lame. Une goutte de suspension est bien mélangée à une goutte d'anti-

sérum; nous utilisons toujours une lame-témoin sur laquelle nous mélangeons une goutte de suspension à une goutte de solution physiologique. Nous conservons les préparations ou l'agglutination est présente pour l'examen de la réaction plus tardive du gonflement de la capsule.

En fait l'agglutination nous a servi pour éliminer toutes les souches qui ont été négatives, parce que les suspensions non agglutinées ne montrent jamais le gonflement capsulaire. Une agglutination positive est due soit à l'antigène capsulaire, soit à l'antigène somatique (l'antigène R. pour les formes "rough" et l'antigène M pour les formes muqueuses; ce dernier, cependant ne se distingue pas sérologiquement de l'antigène capsulaire).

Une agglutination capsulaire typique apparaît comme formée de disques minuscules. Une agglutination somatique O ou R a une forme granulaire. Cependant, cette distinction n'est pas toujours nette. En général, les agglutinations de Klebsiella ont un aspect varié et souvent polymorphe. L'intensité de l'agglutination n'est pas en rapport avec le gonflement puisque ce dernier peut se reproduire aussi bien avec des suspensions fortement ou faiblement agglutinées. Il est facile d'observer que plusieurs souches de Klebsiella sont agglutinées par de nombreux antiséra, mais qu'il n'y a cependant qu'un seul sérum produisant le gonflement. Cette dernière règle a ses exceptions et parfois nous trouvons des souches "poly-gonflées" (voir plus loin, Tableau 9).

6. A. 5. a) Le gonflement de la capsule

Pour qu'une souche de Klebsiella présente le phénomène de gonflement capsulaire, il faut que la capsule soit bien développée; une bactérie sans capsule comme une bactérie n'ayant pas sécrété une substance visqueuse ne présente aucune image de gonflement en présence d'antisérum.

Plusieurs auteurs ont étudié les conditions nécessaires pour la formation de la capsule ou de la substance visqueuse (slime). La capacité de produire la capsule ou la substance visqueuse dépend d'une part de la souche (facteur génétique) et d'autre part du milieu environnant. Pour résumer les conditions, nous pouvons dire qu'un rapport sucre/azote élévé favorise la formation du polysaccharide capsulaire. La présence du saccharose parmi les sucres est aussi particulièrement déterminant.

Avant d'effectuer le test du gonflement, nous repiquons toutes les souches présentant des agglutinations positives, trois fois de suite sur le milieu de "Worfel Ferguson" (milieu contenant une quantité importante de saccharose comme source de carbone). Après trois repiquages, les cultures deviennent suffisamment muqueuses et développent bien leurs capsules (coloration de la capsule avec le bleu de méthylène positive).

6. A. 5. b) Technique de la coloration de la capsule

- déposer une goutte de suspension bactérienne à l'extrémité de la lame,
- ajouter une petite goutte d'encre de chine,
- mélanger et étaler en film mince et régulier,
- laisser sécher,
- fixer à l'alcool ($95^{o}$) pendant une minute,
- laisser sécher,
- colorer au bleu de méthylène (solution aqueuse 1/10) pendant 30 secondes.
- examiner au microscope (à l'immersion) la capsule, qui est visualisée autour du corps bactérien et dans le cas des cultures capsulées prend souvent des dimensions considérables (alo clair autour d'un corps bactérien bleu).

6. A. 5. c) Technique pour le gonflement de la capsule

EDWARD and FIFE (1972), DURLAKOWA et al. (1967). A partir des plaques Worfel-Ferguson et après trois repiquages successifs (voir plus haut), nous préparons des suspensions bactériennes de densité moyenne: le but est d'obtenir environ 30 bactéries par champ; si ce nombre est supérieur, la lecture est difficile du fait de la formation d'agglutinats. La suspension est préparée dans de l'eau physiologique (NaCl 0,85 %). Une goutte de cette suspension est posée sur une lame précédemment dégraissée au moyen d'un mélange d'alcool absolu et d'éther et nous ajoutons une goutte d'antisérum et une goutte de bleu de méthylène 1/10 à pH 10.8. Nous mélangeons bien et nous couvrons avec un porte-objet le témoin contenant les bactéries suspendues dans la solution saline. Nous observons au microscope 20 minutes après le contact de l'antigène et de l'anticorps. Il est nécessaire de refaire une lecture après la première lecture car le développement du phénomène du gonflement nécessite plus de temps que l'agglutination.

Une réaction de gonflement positive confirme que l'agglutination précédemment observée était bien une réaction capsulaire (l'agglutination en tube n'est pas indiquée parce qu'il est impossible de distinguer une agglutination K d'une agglutination O).

## 6. B) RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le tableau 8 nous résumons les types capsulaires les plus fréquents.

TABLEAU 8

Gonflement
(Nombre de souches et pourcentage)

| | | net | faible | total |
|---|---|---|---|---|
| a) le type capsulaire | 7 | 12 | 2 | 14 |
| b) le type capsulaire | 1 | 7 | 3 | 10 |
| c) le type capsulaire | 65 | 7 | 0 | 7 |
| d) le type capsulaire | 24 | 7 | 2 | 9 |

Les résultats sérologiques complets sont représentés dans le tableau 9 (voir page suivante). Dans ce tableau nous observons que quelques souches réagissent avec plus d'un sérum type. Certains auteurs (FINLAND 1967) incriminent le type capsulaire 1 comme seul responsable des pneumonies à Klebsiella. Cette opinion n'est pas confirmée aujourd'hui. Le nombre de types capsulaires à l'époque était modeste et l'ensemble des tableaux cliniques, plus simple. En fait aujourd'hui l'antibiothérapie avec ses succès et ses échecs a changé considérablement le tableau clinique. Ce changement est plus marquant aussi parce que le nombre des patients "compromis" a sensiblement augmenté.
Plusieurs types capsulaires sont aujourd'hui responsables des bronchopneumonies à Klebsiella. En consultant les dossiers des malades nous avons dépisté des pneumonies dues aux types capsulaires 1, 8 et 47 (tous trois K. aerogenes). D'autres bronchopneumonies importantes étaient dues à K. aerogenes non typisables. Un cas d'infection de gravité moyenne due au type capsulaire 7 (K. species) était probablement d'origine hospitalière.

Une importante infection urinaire chez un nourrisson était due au type capsulaire 8. Ceci correspond aux données sérologiques de Ørskov et Kauffmann. Nous citons aussi qu'une infection urinaire post-septicémique chez un nourrisson était due au type capsulaire 41 (K. aerogenes). Les souches appartenant au type capsulaire 65 ne sont pas impliquées dans les infections de gravité importante ou moyenne. On peut supposer que ce type capsulaire tient des souches de virulence basse.

En conclusion, le dépistage sérologique est aussi un moyen d'évaluer la virulence des souches de Klebsiella.

TABLEAU 9

TYPISATION SELON LA TECHNIQUE DU GONFLEMENT CAPSULAIRE

| a) | Gonflement net | Gonflement faible | Gonflement O Agglutination + | Agglutination O |
|---|---|---|---|---|
| Type 1 | 7 | 3 | 21 | |
| Type 2 | 0 | 0 | 3 | |
| Type 3 | 1 | 1 | 2 | |
| Type 4 | 0 | 0 | 3 | |
| Type 5 | 0 | 0 | 1 | |
| Type 6 | 0 | 0 | 2 | |
| Type 7 | 12 | 2 | 20 | |
| Type 8 | 2 | 0 | 6 | |
| Type 9 | 2 | 0 | 4 | |
| Type 10 | 2 | 0 | 5 | |
| Type 11 | 1 | 0 | 1 | |
| Type 13 | 1 | 0 | 1 | |
| Type 24 | 7 | 2 | 11 | |
| Type 26 | 3 | 0 | 13 | |
| Type 31 | 1 | 0 | 1 | |
| Type 35 | 1 | 0 | 1 | |
| Type 37 | 1 | 0 | 1 | |
| Type 41 | 2 | 0 | 1 | |
| Type 47 | 2 | 0 | 1 | |
| Type 54 | 1 | 0 | 1 | |
| Type 55 | 2 | 0 | 1 | |
| Type 65 | 7 | 0 | 11 | |
| Type 66 | 1 | 0 | 1 | |
| TOTAL | 62 | 10 | 11 malades<br>111 agglutinations | 13 |

b) 4 souches poly-gonflées

RESUME

Le type capsulaire 7 est le plus fréquent (12 %) parmi les souches étudiées (13 % en comptant les souches qui réagissent par un gonflement avec plus d'un sérum-type).

Les types capsulaires 1, 24 et 65 viennent ensuite avec 7 % des souches et pour chaque type capsulaire.

# CHAPITRE 7
# EPIDEMIOLOGIE INTRAHOSPITALIERE

## 7. A. 1) INTRODUCTION

L'épidémiologie de Klebsiella est étudiée aux Etats-Unis et dans quelques pays d'Europe comme le Danemark et la Pologne, ainsi qu'à Lille (France). Les données épidémiologiques ne sont pas les mêmes dans les deux continents. En Europe ce sont les types capsulaires 1, 2, 3, 4, 5 et 6 qui sont les plus fréquents, tandis qu'aux Etats Unis on trouve fréquemment d'autres types capsulaires, comme le 24 et le 26.

## 7. A. 2) EPIDEMIOLOGIE DE KLEBSIELLA AUX ETATS-UNIS

Les recherches épidémilogiques et sérologiques effectuées à l'Hôpital de Boston démontrent que les types capsulaires 1, 3, 4 et 5 sont associés le plus fréquemment avec des infections du système respiratoire. (STEINHAUER B. et al., 1966), (EICKHOFF T. et al., 1966). Seulement 14 % des malades de ces quatre types ont présenté des signes de pneumonie lobaire. La majorité des malades souffraient de bronchopneumonie ou de bronchite. 80 % des malades présentant le type capsulaire 2 souffraient d'infection urinaire. La majorité, 56 à 90 % de tous les autres types capsulaires concernaient des infections urinaires et le type capsulaire le plus fréquent était le type 24 (DANS et al., 1967). Ce type capsulaire est particulièrement intéressant. 86 % des malades de ce type, avec l'infection urinaire, avaient une anamnèse d'instrumentation le plus souvent avec des cathéters urinaires (cette observation concerne aussi le type capsulaire 2. (STEINHAUER B. et al., 1966).

On a très rarement trouvé le type capsulaire 24 durant les quatre premiers jours d'hospitalisation; en fait, 88 % des malades du type capsulaire 24 avaient contracté l'infection dans l'hôpital (très peu de malades des types capsulaire 1, 3, 4 et 5 et seulement 44 % du type capsulaire 2 avaient contracté l'infection à l'hôpital).

Les patients infectés avec les types capsulaires 1,3,4 et 5 avaient reçu précédemment un traitement avec les antibiotiques, mais moins fréquemment que les autres malades.

Un nombre relativement important de patients présentaient une bactériémie. 10 % des bactériémies ont débuté par une infection du système respiratoire; alors qu'un nombre beaucoup plus élevé - 48 % - ont débuté par une infection du système génito-urinaire.

Le reste était dû à des plaies d'abcès, etc. Les malades infectés avec les types capsulaires 1,3,4 et 5, ainsi que par les souches non-typisables présentent plus rarement que tous les autres malades des bactériémies. Un nombre très élevé - 70 % des infections avec bactériémie, était dû à une infection contractée à l'hôpital. La majorité des patients avaient bénéficié précédemment d'un traitement avec un ou plusieurs antibiotiques.

La mortalité des patients présentant une bactériémie était de 52 %. La moitié des malades décédaient 48 h après la première hémoculture positive.

Le nombre des patients qui présentaient une bactériémie due à une infection du système respiratoire était relativement bas - 20 % - (voir aussi plus haut), mais 83 % de ces patients sont morts.

Les patients infectés avec des types capsulaires de chiffre élevé, présentaient plus fréquemment des infections urinaires et moins fréquemment des bronchopneumonies, abcès, etc. Le type capsulaire 24:

a) était associé à des infections urinaires,
b) était très résistant aux antibiotiques et
c) était contracté dans l'hôpital.

(STEINHAUER B. et al., 1966).

## 7.A.3) NOUVELLE EPIDEMIOLOGIE INTRAHOSPITALIERE

Parmi les 72 types capsulaires commercialisés de Klebsiella, les plus fréquemment rencontrés par des différents chercheurs, surtout en Europe et aux Etats-Unis, sont les suivants: 1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10,24,26, et 65. C'est au moyen des séra cités ci-dessus que nous avons typisé nos souches pour tenter d'établir une corrélation entre type capsulaire et incidence dans les différents services hospitaliers. Au fur et à mesure de notre étude nous avons rencontré des souches de Klebsiella qui n'étaient pas typables avec les séra à notre disposition. Nous avons alors fait appel à la collaboration de Mme I. ØRSKOV (Copenhague) qui a eu l'amabilité de les typiser. Ces souches appartenaient aux types capsulaires 13,31,35,37,41,47,50,54,55,66. Le nombre de cas étudiés pendant notre travail est limité et ne permet pas de tirer des conclusions significatives dans tout les cas. Toutefois nous croyons être en mesure de signaler les services et/ou les départements hospitaliers ou l'incidence d'un type donné est significative:

——— Dans le Service de Matérnité d'Obstétrique de Gynécologie, nous n'avons rencontré que le type 1.

——— Ce même type est aussi rencontré dans les Services non Chirurgicaux à l'exception de la Chirurgie Infantile.

——— Le type 7 est le plus fréquent, aussi bien dans le CHUV qu'à l'extérieur. (voir tableau 10)

——— Le type 24 se rencontre dans les services chirurgicaux ou aux unités des soins aux personnes âgées, mais pas dans les services de médecine interne.

——— Les types 2,4,5,6 ne se rencontrent pas dans le CHUV, ni à l'extérieur. Ceci contraste avec les observations faites à Copenhague et aux Etats-Unis.

Il doit exister certains types capsulaires "résidant" au CHUV: les types 8,9,24 et 26 qui se propagent seulement à l'intérieur de l'enceinte hospitalière et qui ne se rencontrent jamais ailleurs.

——— Le type 9 est un ou le type "chirurgical". Son absence dans les autres services est caractéristique.

——— Le type 1 n'a été rencontré que dans les services logés à l'est de la rue du Bugnon. [1)]

Une étude statistique de la similarité d'incidence des sérotypes dans le CHUV a montré un certain degré de ressemblance pour certains services. Cependant nous n'avons pas pu établir de relations fonctionnelles entre eux (Policlinique-Pédiatrie, par exemple). Parmi les facteurs qui sont potentiellement capables d'assurer une diffusion des Klebsiella, il faut mentionner l'ensemble des facteurs d'apport tels que le recrutement des malades, la fréquentation commune des services (comme la Radiologie), la circulation du personnel commune ou de liaison, la fréquence d'utilisation de techniques d'assistance instrumentale (sondes, etc.). Il faut aussi mentionner les facteurs sélectifs spécifiques que constituent les traitements antibiotiques.

1) Les services de Maternité (Gynécologie et Obstétrique), de Médecine interne, de Pédiatrie, Gériatrie, et Physiatrie et des Prématurés sont situés à l'est de la rue de Bugnon, tandis que les services de Chirurgie de l'Urologie et de Neurochirurgie se trouvent à l'ouest de cette rue.

TABLEAU 10

REPARTITION DES TYPES CAPSULAIRES DANS LES SERVICES DU C.H.U.V.

| Type capsulaire | Nestlé | Chirurgie | Neurochirurgie | Urologie | Sandoz | Pédiatrie | Prématurés | Maternité | Chirurgie infantile. | Bourget | Beaumont | Cardiologie | Policlinique médicale. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | + | | | | + | + | | + | + | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | + | | + | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | + | + | + | + | + | + | | + | + | | + | + |
| 8 | + | + | | | | | | | + | + | | | |
| 9 | | + | | + | | | | | | | | | |
| 10 | + | | | | | | | | | + | | | |
| 24 | | + | + | + | + | | + | | | | + | | |
| 26 | + | + | | | + | + | | | | | | | + |
| 65 | + | + | | + | | + | + | | | + | | + | + |

Légende: + présence du type capsulaire correspondant.
- absence du type capsulaire correspondant.

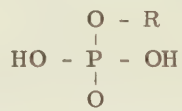
# CHAPITRE 8
# PHOSPHATASE ACIDE

## 8. A) ETUDE DE LA PHOSPHATASE ACIDE. INTRODUCTION

La phosphatase acide est un enzyme qui effectue l'hydrolyse d'un grand nombre d'esters de l'orthophosphate, ainsi que des réactions de transphosphorylation. (RICHTERICH R., 1967).

La différence entre phosphatase acide et phosphatase alcaline est basée sur le fait que les deux enzymes présentent des vitesses de réaction optimales à des pH complètement différents.

Des différences d'action essentielles existent entre ces deux phosphatases. HOLLANDER, (1971).
La phosphatase alcaline hydrolyse des monoesters O-substitués de l'acide orthophosphorique:



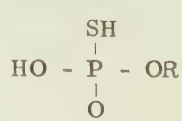
(1)

et les monoester S-substitués de l'acide phosphothioïque:

(2)

Les valeurs de $K_m$, ainsi que la vitesse maximale est la même pour ces deux substances.

La phosphatase acide hydrolyse les monoesters O-substitués de l'acide phosphorathioïque



(3)

mais ne peut pas hydrolyser les monoesters S-substitués de l'acide phosphorathioïque (2). Ceci prouve qu'une liaison avec

l'oxygène est nécessaire et ne peut pas être remplacée par un atome de soufre. GRAY C., (1971).

(La phosphatase alcaline ne peut pas hydrolyser les monoesters O-substitués de l'acide phosphorothioïque (3): on peut ainsi conclure que les deux groupements OH sont nécessaires pour l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline). (HOLLANDER, 1971).

Plusieurs phosphatases acides ont été étudiées: les phosphatases prostatiques, hépatiques, rénales, spléniques, des érythrocytes et du plasma. De même les phosphatases acides des moisissures, des levures et des bactéries suivantes: Staphylococcus aureus (poids moléculaire: 58'000), Vibrio parahaemolyticcus et Escherichia coli.

La phosphatase acide d'Escherichia coli est composée de quatre fractions ainsi que l'étude par électrophorèse de zone l'a montré; la fraction qui migre le plus rapidement contient la plus importante proportion d'activité enzymatique et elle a été purifiée par filtration sur gel avec Sephadex G - 75, dans une solution d'acide acétique 1 M.

Des études de sédimentation ont démontré que le monomère de l'enzyme a un poids moléculaire un peu moins grand que 20'000. La concentration des solutions du monomère dans l'acide acétique 1 M conduit à la polymérisation. La phosphatase acide d'Escherichia coli agit sur des substrats tels que les esters de phényl monophosphate et l'hexose monophosphate. Il reste stable dans l'acide acétique 1 M (en l'absence de sels). (VON HOFSTEN et PORATH, 1962)

8.A.1) Mesure de l'activité phosphatasique

La phosphatase acide est un enzyme qui, avec d'autres enzymes comme la coagulase, la DNase etc., est considéré comme un des déterminants de la virulence du genre Staphylococcus. Nous avons observé que certaines souches de Klebsiella présentaient une activité phosphatasique. Nous avons pensé que la présence de cet enzyme pourrait traduire un potentiel virulent chez Klebsiella. Nous avons donc mesuré l'activité de cet enzyme afin de pouvoir comparer l'activité phosphatasique des souches, à la gravité du tableau clinique des infections que ces souches avaient provoquées.

Pour mesurer l'activité de la phosphatase acide, nous faisons croître les bactéries dans des milieux constitués de la solution de base suivante:

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 2 | g |
| $MgSO_4$ | 0,25 | g |
| $K_2SO_4$ | 1 | g |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1 | g |
| Extr. levures | 2 | g |
| Agar | 15 | g |
| $H_2O$ dist. | 1.000 | ml |

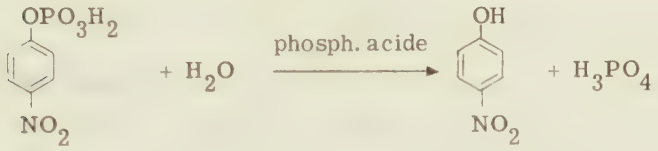
à laquelle deux sources de carbone ont été ajoutées pour constituer deux milieux différents. Le premier contient 1 ‰ de bactopeptone et 3 ‰ de succinate; c'est le milieu "succinate" (S). Le second 1 ‰ de bactopeptone, 3 ‰ de succinate et 3 ‰ de glucose; c'est le milieu "glucose + succinate" (GS). Les bactéries sont cultivées sans agitation à 37° dans ces deux milieux pendant 24 h. La densité est alors ajustée à la valeur 58 % de la déviation du galvanomètre du néphélomètre EEL [1]. La déviation 100 % étant donnée par un étalon externe en verre dépoli.

---

1) Electroselenium (Sussex, Angleterre)

8. A. 2) Méthode utilisée pour la mesure de la phosphatase acide

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction suivante: L'hydrolyse d'un substrat incolore, le p-nitrophényl-phosphate (PNP) forme le p-nitrophénol:




8. A. 3) Préparation des solutions

1. Tampon citrate

0,09 M, pH 4,9

| | |
|---|---|
| Acide citrique | 18,9 g |
| $H_2O$ | 600 ml |
| NaOH 1 N pH ad 4,9 | |
| $H_2O$ ad | 1000 ml |

2. Etalon de p-nitrophénol

$2.10^{-4}$ M

| | |
|---|---|
| NP | 14 mg |
| $H_2O$ ad | 500 ml |

3. Phosphate de p-nitrophénol

| | |
|---|---|
| PNP sel disodique x 6 mol $H_2O$ | 40 mg |
| $H_2O$ | 10 ml |

4. Tampon citrate-substrat

| | |
|---|---|
| PNP (solution 3) | 1 vol. |
| Tampon citrate (solution 1) | 1 vol. |

Ne mélanger juste avant l'emploi que la quantité nécessaire aux dosages.

5. Hydroxyde de Na

0,05 N

A préparer à partir de Fixanal ou Titrisol (Merck) 1/10 éq.

8. A. 4) Conservation des solutions

Congelées et réparties dans des tubes plastiques, les solutions tampon peuvent être gardées indéfiniment. Etalon de p-nitrophénol: conservé en flacon bien bouché et à l'abri de la lumière. Substrat de phosphate de p-nitrophénol (PNP): solution instable du fait de l'hydrolyse spontanée lente.

Alors que le substrat p-nitrophényl-phosphate est incolore en milieu alcalin, le produit de la réaction, le p-nitrophénol, relativement incolore en milieu acide, est jaune en milieu alcalin. Nous mesurons donc au spectrophotomètre, à la longueur d'onde de 405 nm, le p-nitrophénol libéré, après l'adjonction d'alcali (0. 5 ml de NaOH 0. 05N) qu'arrête la réaction catalysée par l'enzyme.

8. A. 5) Technique de la mesure de l'activité phosphatasique

A partir de la solution tampon citraté 0. 09 M à pH 4. 7, nous ajoutons une partie d'une solution du p-nitrophényl phosphate (solution 3). La réaction comporte un standard, un blanc et les tubes d'analyse. Dans le blanc et les tubes d'analyse nous mettons le tampon avec le substrat p-nitrophényl phosphate (7. 6 mM) et nous ajoutons 25 µl de suspension bactérienne aux tubes d'analyse et la même quantité au blanc. Nous incubons les tubes pendant 30 minutes à $37^{o}$. Après incubation nous ajoutons du NaOH 0. 05 N, nous centrifugeons à 2500 t/min. pendant 10 minutes et nous mesurons la densité optique du surnageant.

Nous obtenons ensuite nos valeurs réelles d'activité phosphatasique en soustrayant la densité optique du blanc de la densité optique de chaque tube d'analyse et en divisant par la densité optique du standard:

$$\text{activité} = \frac{\text{D.O.}_{an} - \text{D.O.}_{bl}}{\text{D.O.}_{st}}$$

8. B. 1) Résultats de l'activité de la phosphatase acide selon des espèces

La distribution de l'activité mesurée dans les différentes espèces est présentée dans les figures qui suivent. Les valeurs les plus fréquentes sont représentées dans le tableau suivant:

TABLEAU 11

MODE DE LA VALEUR DE PHOSPHATASE ACIDE

| | | |
|---|---|---|
| K. aerogenes | /S ' | 0. 2-0. 3 |
| K. aerogenes | /GS' | 0. 2-0. 3 |
| K. species | /S ' | 0. 3-0. 4 |
| K. species | /GS' | 0. 3-0. 4 |
| K. oxytoca | /S ' | 0-0. 1 |
| K. oxytoca | /GS' | 0. 1-0. 2 |
| K. edwardsii | /S ' | 0. 2-0. 4 |
| K. edwardsii | /GS' | 0. 2-0. 5 |
| K. pneumoniae | /S ' | 0. 1-0. 2 |
| K. pneumoniae | /GS' | 0. 1-0. 2 |

On peut donc constater que les valeurs les plus fréquentes sont différentes pour les différentes espèces. Cependant les modes concernant les deux milieux sont relativement superposables.

Nous constatons aussi que les valeurs de l'activité phosphatasique de K. species sont plus élevées que celles de l'activité aerogenes.

Les valeurs d'activité phosphatasique de K. oxytoca sont très basses, tandis que les valeurs de K. species et de K. aerogenes sont nettement plus hautes.

8. B. 2) Résultats de l'activité de la phosphatase acide selon les espèces et les types capsulaires

Nous examinerons maintenant les activités phosphatasiques des types capsulaires de K. aerogenes, de K. species et K. oxytoca cultivées dans les milieux S' et GS'.

8. B. 2. a) K. aerogenes

Si l'on compare la moyenne des activités des souches[1] cultivées en milieux S' et GS' des types capsulaires les plus fréquents (1, 7, 24 et 65), on remarque que celles du type capsulaire 24 sont supérieures à celles des types capsulaires 1 et 7.

| | | |
|---|---|---|
| K. aerogenes 24 | /S ' | 0. 289 |
| K. aerogenes 24 | /GS' | 0. 380 |
| K. aerogenes 1 et 7 | /S ' | 0. 230 |
| K. aerogenes 1 et 7 | /GS' | 0. 259 |

8. B. 2. b) K. species

Les valeurs du type capsulaire 7 sont parmi les plus élevées de toutes les souches examinées.

| | | |
|---|---|---|
| K. species 7 | /S ' | 0. 337 |
| K. species 7 | /GS' | 0. 310 |

1) Somme des activités phosphatasiques des souches étudiées divisée par le nombre de ces souches.

8. B. 2. c) K. oxytoca

L'activité de tous les types capsulaires de K. oxytoca est basse. Les valeurs du type capsulaire 7 sont les plus basses de toutes les souches de Klebsiella examinées.

| | | |
|---|---|---|
| K. oxytoca 1 | /S ' | 0. 149 |
| K. oxytoca 1 | /GS' | 0. 169 |
| K. oxytoca 7 | /S ' | 0. 080 |
| K. oxytoca 7 | /GS' | 0. 117 |
| K. oxytoca 65 | /S ' | 0. 129 |
| K. oxytoca 65 | /GS' | 0. 154 |

8. B. 3) Conditions métaboliques des Enterobacteriaceae qui utilisent le succinate comme source de carbone

La fraction NAD/NADH, chez les cellules bactériennes (Enterobacteriaceae) qui croissent en présence du succinate est égal à 1. Par conséquent, le NADH est présent dans une proportion considérablement moins abondante que chez les Enterobacteriaceae, qui croissent en présence d'un sucre comme le glucose (SANWAL, 1970). La néoglucogenèse prédomine aux dépends de la glucolyse chez les Enterobacteriaceae qui utilisent le succinate comme source de carbone: dans ce cas les bactéries induisent les systèmes enzymatiques qui conduisent à la synthèse du PEP (phospho-enol pyruvate).

En présence du succinate, l'enzyme induit est la PEP caroboxy-kinase. Le résultat est une production importante du PEP au dépend de l'ATP.

Un autre point à considérer est que les Enterobacteriaceae qui croissent en présence du succinate produisent du pyruvate par décarboxylation du malonate.

Un enzyme induit dans ce cas:

le NADP - spécifique enzyme malique; cet enzyme appartient

à une voie métabolique qui conduit depuis le malonate à la formation de l'Acétyl- CoA.

Nous avons vu plus haut que la néoglucogenèse prédomine chez les bactéries qui croissent en présence du succinate; cette néoglucogenèse est contrôlée par modulation de l'ADP - glucose pyrophosphorylase, qui transforme le glucose-1-phosphate en ADP glucose (qui est un donneur de résidus glucosyl (GREENBERG and PREISS, 1964). Cet enzyme est activé principalement par le FDP, ainsi que par les intermédiaires de la glycolyse; le phosphate, l'AMP et l'ADP inhibent cet enzyme. (COHEN, 1971).

8. B. 4) Conditions métaboliques des Enterobacteriaceae utilisant le glucose comme source de carbone

Si une Entérobactérie utilise la glucose de manière aérobie, c'est la présence de NADH qui prédomine (SANWAL, 1970). La fraction NAD/NADH est 0,5 chez les cellules qui croissent en présence du glucose, tandis que la même fraction est de 1.0 chez les cellules qui croissent en présence du succinate.

Nous constations que le niveau du NADH est un indicateur de l'état de glucolyse qui caractérise les cellules bactériennes croissant en présence du glucose. (SANWAL, 1970). Le NADH est principalement le produit des réactions des déshydrogenation du cycle de Krebs et chez les Enterobacteriaceae, le cycle de Krebs est aussi contrôlé par le NADH. Les Enterobacteriaceae utilisent largement la glucolyse quand elles croissent en présence du glucose de façon aérobie (SANWAL, 1970).

Les enzymes suivants sont réprimés en présence du glucose: La succinate déhydrogenase, la succinate thiokinase, et la a-katoglutarate déhydrogenase.

8. B. 5) Conditions métaboliques du milieu contenant Glucose + Succinate

La présence simultanée, dans un milieu de culture, du glucose et d'une autre substance carbonée (dans notre cas, le succinate), conduit à une situation métabolique nommée répression catabolique. La répression catabolique consiste en une diminution de la vitesse de synthèse de certains enzymes et spécialement de ceux qui sont responsables du métabolisme catabolique, en présence du glucose (PAIGEN and WILLIAMS, 1970). Il est maintenant certain que ce n'est pas le glucose lui-même, mais certains produits de son métabolisme (surtout certains produits précoces de la glycolyse) qui sont les meilleurs répresseurs. Ces inhibiteurs agissent probablement pas à l'état libre, mais après combinaison avec un nucléotide (SENEZ, 1968).

Une conséquence de la co-présence du glucose dans un milieu de croissance est l'augmentation de la concentration de l'ATP, à cause de la glucolyse; l'ATP conduit à une diminution de la concentration cellulaire de l'AMP cyclique (STANIER, DOUDOROFF and ADELBERG, 1970).

Dans notre milieu de croissance contenant glucose + Succinate, aucun des deux types de métabolisme précédemment mentionnés - Glycolyse et néoglycogenèse - n'est prédominant. La glucolyse partage avec la glycogenèse le blocage des enzymes constitutifs qui, depuis le PEP, produisant le FDP (FDP = fructose 1,6 phosphate SANWAL, 1970). Les autres cultures bactériennes qui croissent dans des conditions de glycogenèse (croissance avec le succinate), le PEP produit du pyruvate et de l'ATP au lieu de produire des trioses phosphates; on peut dire que cette situation métabolique est une situation de gaspillage (wasteful SANWAL, 1970), principalement parce qu'il y a une accumulation de pyruvate[1] qui est un produit dans les conditions de glu-

1) Ce pyruvate est ensuite utilisé pour la synthèse du glucogène par la voie du gluconéogenèse.

cogenèse par l'enzyme malique NADP - spécifique. Cet enzyme est déréprimé pendant la croissance en présence du succinate (KATSUKI, TAKEO, KAMEDA and TANAKA, 1967).

La situation est différents quand la glucolyse devient prédominante. Dans ce cas, la source du pyruvate et de l'ATP est le PEP et y est nécessaire de stopper le passage du pyruvate dans les voies métaboliques subjacentes: pendant la croissance en présence du glucose, ceci s'effectue par répression de l'enzyme malique NADP - spécifique (SANWAL and SMANDO, 1969). Ainsi, l'enzyme malique NADP - spécifique qui différencie la glycogenèse (croissance en succinate) de la glucolyse - répression catabolique (croissance en glucose) est déréprimé pendant la glucogenèse et réprimé pendant la glucolyse - répression catabolique.

HARRISON and MAITRA (1969) ont étudié la croissance de K. aerogenes dans un chemostate. Après addition de glucose dans une culture limitée en glucose une augmentation du taux de respiration est observée, ainsi qu'une augmentation rapide du glucose-6-phosphate; le contenu en ATP baisse. Il est probable qu'après l'augmentation de la quantité du glucose-6-phosphate, il y a une augmentation de l'utilisation de l'ATP, pour la synthèse des polysaccharides (SEGEL, CATTANEO and SIGAL, 1963).

Après addition du succinate dans cette culture limitée en glucose HARRISON and MAITRA, (1969) observent une augmentation de la respiration accompagnée d'une petite augmentation de la quantité d'ATP. Il paraît que le succinate provoque une augmentation de la formation d'ATP, accompagnée d'un renouvellement (turnover) élevé d'ATP, qui conduit ensuite à une baisse d'ATP (HARRISON and MAITRA, 1969). Probablement, le renouvellement élevé de l'ATP est due à l'énergie utilisée pour l'incorporation du carbone dans le matériel cellulaire; 1/6 seulement

du succinate est oxydé et le reste est incorporé dans le matériel cellulaire. Selon ces auteurs, la vitesse du renouvellement d'ATP est en relation avec le "pool" d'ATP cellulaire et la phosphohydrokinase est la molécule régulatrice de la glucolyse.

En conclusion, notre milieu glucose + Succinate présente un équilibre métabolique et les deux états métaboliques extrêmes, glycolyse et néoglycogenèse sont rapprochés. Par conséquent, la fraction NADH déjà mentionnée (page 74) prend une valeur intermédiaire entre 0.5 et 1.

## 8. C) VIRULENCE ET PHOSPHATASE ACIDE

La virulence d'une bactérie est son pouvoir de multiplication dans l'organisme-hôte et la pathogenicité, sa capacité de provoquer des lésions.

La virulence est une propriété qui dépend de la souche microbique, de l'hôte et des conditions de l'interaction bactérie-hôte. Les conditions dans lesquelles l'hôte s'expose à la bactérie ont une grande importance (DAVIS et al., 1970).

En partant de l'expérience courante de la détermination de la virulence de Staphylococcus aureus à l'aide du test de la DNase, nous nous sommes posé la question si des tests analogues pourraient nous aider à établir une notion de la virulence chez des bactéries Gram négatif et en particulier chez Klebsiella. Evidemment l'emploi d'un animal sensible et spécifique pour la virulence de Klebsiella aurait résolu la notion de virulence et pathogenicité Bien que cette information ne serait pas toujours applicable pour l'homme.
Pour ces raisons nous nous sommes amenés à étudier l'existence des tests auxiliaires entre autres de la présence de la phosphatase acide et les différentes quantités de l'enzyme pour les différentes espèces de Klebsiella en milieu hospitalier ou non et en rapport avec l'image clinique. Ainsi la notion de la virulence serait quantitative, donc mesurable et le médecin pourrait en tirer des renseignements fort utiles. De cette manière "l'agressivité" de la bactérie serait évaluée et le traitement mieux envisagé.

BARBER et KUPER, (1951) ont les premiers étudié la phosphatase acide de Staphylococcus plus précisément un enzyme intracellulaire. (CANNON and HAWN, 1963, ELEK, 1959).

D'après des observations au microscope électronique, la phosphatase acide se trouve dans la membrane cytoplasmique (où sont localisés aussi les cytochromes, les enzymes de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs) comme dans le cytoplasme. (SAWASHIGE, 1967). Il y a une corrélation entre l'activité phosphatasique et le lysotype (PAN and BLUMENTHAL, 1961).

La présence simultanée de la phosphatase acide, des cytochromes et des enzymes de la chaîne respiratoire dans la même structure cellulaire - la membrane cytoplasmique - (SENEZ, 1968), nous suggère que la phosphatase acide alimente en phosphate la chaîne des cytochromes.

Cette hypothèse est basée aussi sur un argument biochimique; pendant la condensation de l'ADP et du phosphate qui est activé plutôt que l'ADP. (LARNER, 1971). La provenance de ce "pool" de phosphate pourrait être due à l'action des phosphatases non spécifiques.

Selon BOLTON et DEAN (1972) la phosphatase acide de Klebsiella contrôle le "pool" des hexoses et des hexoses phosphates. L'action régulatrice de la phosphatase acide s'exerce selon ces auteurs par un effet de "court-circuit" (short circuiting) au niveau des hexoses phosphates (conversion des hexoses phosphates en hexoses, selon les besoins cellulaires). La phosphatase acide pourrait agir comme une sorte de "pont" entre phosphate organique et phosphate "activé" (sous forme de molécules contenant de liaisons de haute énergie).

8. D. 1) Comparaison de l'activité phosphatique avec la gravité du tableau clinique

Nous avons étudié les dossiers cliniques de 40 malades[1)] et essayé de faire une comparaison entre les données microbiologiques et les données cliniques. Notre but est de savoir s'il y a une relation entre espèce de Klebsiella et la gravité du tableau clinique. Nous avons examiné si la valeur de l'activité de la phosphatase acide est en relation avec la gravité du tableau clinique.

8. D. 2) Critères de gravité de l'infection à Klebsiella

Les infections à Klebsiella sont classées selon des critères de gravité d'infection à des infections importantes, moyennes et légères.

Les infections importantes sont caractérisées par les critères de gravité d'infection suivantes:

a pour les infections respiratoires
a 1) présence de submatité
a 2) présence de signes de condensation pulmonaire
a 3) présence de douleur thoracique intense

b) pour toutes les infections
présence de complications: cardiaques, pulmonaires, rénales etc.

Les infections importantes et les infections moyennes ont les critères de gravité suivants en commun:

---

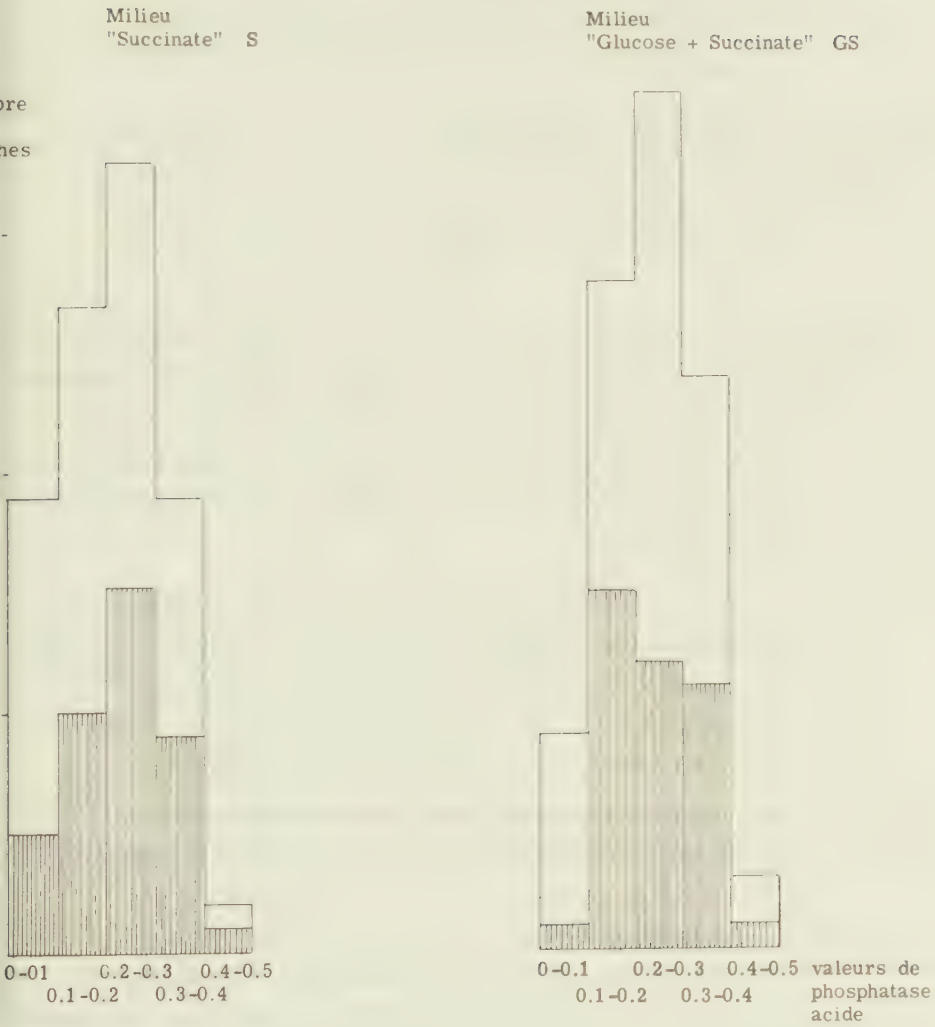
1) Nous notons ici que les informations contenues dans les dossiers étaient insuffisantes et incomplètes et nous avons été obligés de considérer, dans cette recherche, seulement les dossiers, qui nous donnaient des informations suffisantes.
(voir fig. 1).

Fig. 1

Activité phosphatasique

de l'ensemble des souches

et des souches étudiées cliniquement



a) pour les infections respiratoires
   $a_1$) altération de l'état général (malaise, prostration
   $a_2$) présence de fièvre 37,5
   $a_3$) présence de toux

b) pour les infections urinaires
   $b_1$) altération de l'état général (malaise, prostation)
   $b_2$) présence de pyurie (éventuelle)
   $b_3$) présence de pollakiurie
   $b_4$) présence de leucocyturie

c) pour toutes les infections:
   altérations de l'état général (voir tableau 12)

Cependant les infections moyennes se distinguent des infections importantes par l'absence de submatité, de signes de condensation pulmonaire (pour les infections respiratoires), ainsi que par l'absence de complications. Les infections moyennes sont souvent caractérisées par des réactions locales inflammatoires avec douleur.
Les infections légères sont caractérisées:

1) par l'absence d'altération d'état général (malaises prostation)
2) par l'absence de fièvre élevée 37,5. Les états fébriles de l'ordre de 37 - 37,5 caractérisent cette classe d'infection.
3) par des réactions locales inflammatoires sans douleur.

Toutes les trois classes d'infection présentent des valeurs de vitesse de sédimentation élevées. Les critères décrits sont représentés dans le tableau 12.

Il faut noter que ce ne sont pas les signes cliniques isolés, ma l'ensemble des caractères d'un syndrome infectieux qui caractérise la gravité d'infection. La constitution du malade, ainsi que le terrain (malnutrition, alcoolisme, présence de tares hérédi-

taires, d'autres maladies, âge du malade) jouent aussi un grand rôle et contribuent grandement à la manifestation de l'image clinique (FINLAND M., 1967).

Le mode d'activité de la phosphatase acide du genre Klebsiella selon la gravité de l'infection est représentée dans le tableau 13. Nous constatons que le mode des infections importantes, dépasse le mode des infections légères.

La distribution des souches de chaque espèce de Klebsiella dans les 3 classes de gravité des infections figure dans le tableau 14. La fréquence des infections importantes de K. aerogenes et de K. species est assez élevée.

Les figures 2, 3, et 4, sont des histogrammes qui représentent la distribution du mode de l'activité phosphatasique de 3 espèces de Klebsiella les plus fréquentes (K. aerogenes, K. species et K. oxytoca) selon leur grandeur. La comparaison des trois histogrammes nous démontre que le mode de K. oxytoca est nettement inférieur du mode de K. aerogenes et de K. species.

Le mode des 3 espèces de Klebsiella dans les trois classes de gravité des infections est représenté dans le tableau 15 [1)].
Nous observons des valeurs élevées pour les infections importantes pour K. species (0.4) et K. aerogenes (0.3). Avec les deux milieux, la gravité de l'importance de l'infection est proportionnelle à la valeur de la phosphatase acide. Les différences obtenues entre la culture en milieu GS' et en milieu S' sont relativement petites.
De cette manière générale, on constate que dans le milieu GS' l'activité de la phosphatase acide est légèrement plus élevée sans

1) A noter que les infections importantes de K. aerogenes sont dues aux types capsulaires 1,8,41 et 47. Une infection importante de K. species et due au type capsulaire 8.

que cette observation soit une règle pour l'ensemble des souches puisque K. oxytoca présente des activités nettement plus élevées en GS' pour l'ensemble des souches.

Fig. 2

Histogramme de l'activité phosphatasique de K. aerogenes

Fig. 3

Histogramme de l'activité phosphatasique de K. species

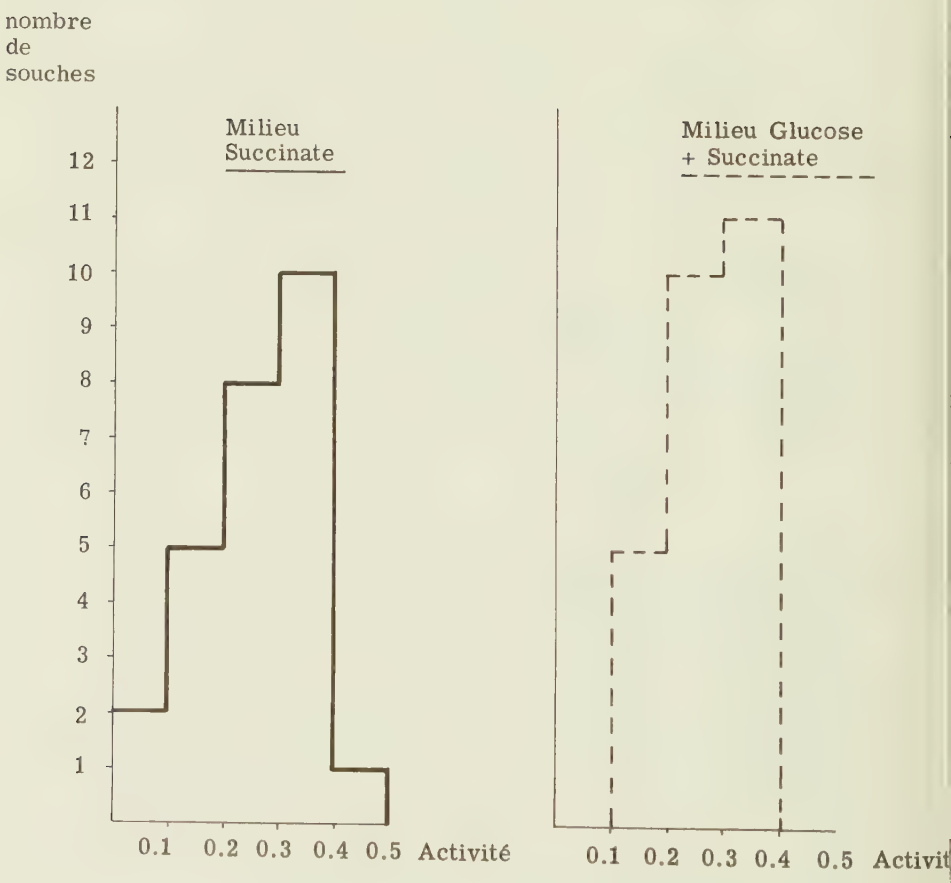
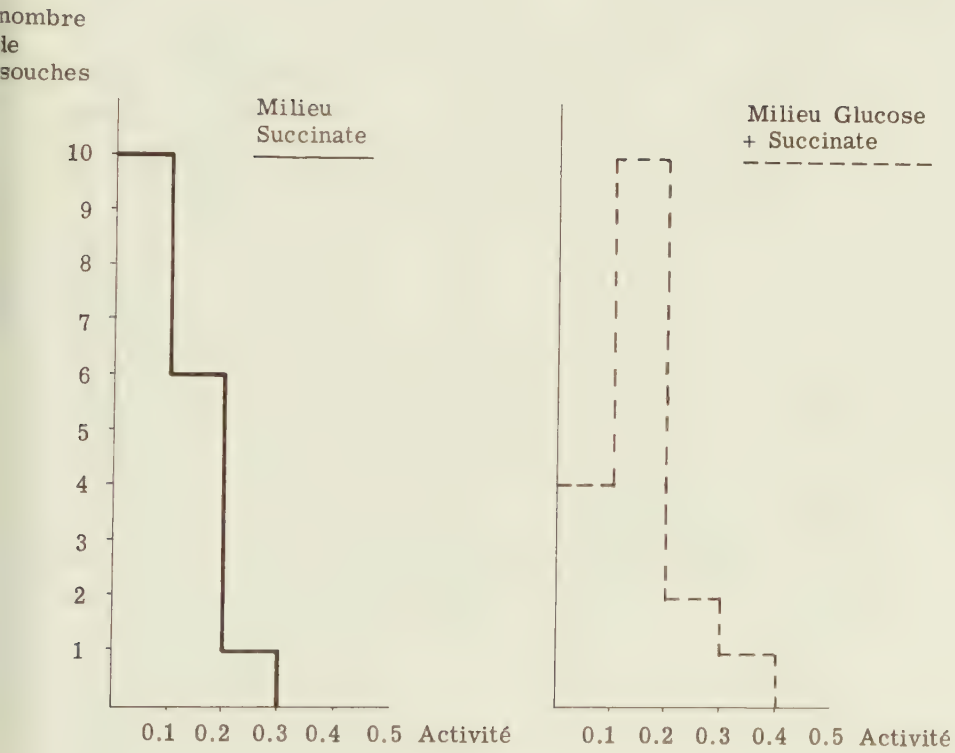


Fig. 4

Histogramme de l'activité phosphatasique de K. oxytoca



8. E. 1) Résultats du travail expérimental personnel d'après l'étude clinique des dossiers des malades

En résumé, nous avons démontré les infections à Klebsiella en 3 classes de gravité légères, moyennes et importantes. Le tableau 12 présente les critères élaborés et reconnus dans les observations cliniques que nous avons consultées. En outre nous avons isolé les infections pulmonaires et urinaires du reste des infections à localisation différente.

La relation entre la gravité des infections à Klebsiella et l'activité phosphatasique des souches isolées des cas étudiés n'est pas indifférente.

En effet, les souches cultivées en milieu au succinate ont montré une activité phosphatasique proportionnelle à la gravité de l'infection qu'elles ont causée. Cultivées en milieu glucosé, elle ne montrent pas les mêmes propriétés avec autant de netteté. Ces résultats sont condensés dans le tableau 13.

Par ailleurs, les espèces de Klebsiella rencontrées dans cette étude ont été distribuées dans les 3 classes de gravité[1)], comme le tableau 14 le présente. On peut y voir la prédominance de K. aerogenes et K. species dans les infections importantes et moyennes. Lorsqu'on distribue les valeurs de l'activité phosphatasique dans les espèces en fonction de la gravité d'infection, on voit que K. oxytoca est exceptionnelle en ce sens que son activité phosphatasique en succinate est basse quelle que soit la gravité de l'infection présente (tableau 15). Les autres espèces, par contre, présentent une activité plus élevée lorsqu'elle étaient associée à une infection importante ou même moyenne.

---

1) A noter que les infections importantes de K. aerogenes sont dues aux types capsulaires 1, 8, 41, et 47. Une infection importante de K. species est due au type capsulaire 7.

TABLEAU 12 CRITERES DE GRAVITE DE L'INFECTION A KLEBSIELLA

| Infections importantes | Infections moyennes | Infections légères |
|---|---|---|
| -- pour les infections respiratoires | | |
| présence de submatité | absence de submatité | |
| présence de signes de condensation pulmonaire | absence de signes de condensation pulmonaire | |
| présence de douleur thoracique | absence de douleurs thoracique | |
| présence de toux | | absence de toux |
| altération de l'état général | | pas d'altération de l'état général |
| présence de fièvre > 37,5 | | absence de fièvre < 37,5 |
| -- pour les infections urinaires | | |
| présence de pyurie | | absence de pyurie |
| présence de pollakiurie, leucocyturie | | absence de pollakiurie, leucocyturie |
| -- pour toutes les infections | | |
| présence de complications cardiaques, pulmonaires, rénales, etc. | pas de complications cardiaques, ni pulmonaires | |
| altération de l'état général | | pas d'altération |
| | réactions locales inflammatoires avec douleur | réactions locales inflammatoires (sans douleur) |
| valeurs de vitesse de sédimentation élevées | | |

TABLEAU 13

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE SELON LA GRAVITE DE L'INFECTION (valeurs médianes)

1. Genre Klebsiella

| | Infections importantes | | Infections moyennes | | Infections légères | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| culture en: | Succinate (S') | Glucose + Succinate (GS') | Succinate (S') | Glucose + Succinate (GS') | Succinate (S') | Glucose + Succinate (GS') |
| activité: | 0. 277 | 0. 272 | 0. 199 | 0. 242 | 0. 088 | 0. 139 |

TABLEAU 14

NOMBRE DE SOUCHES DE CHAQUE ESPECE RENCONTREES DANS LES 3 CLASSES DE GRAVITE DES INFECTIONS

| | Infections importantes | Infections moyennes | Infections légères | Total |
|---|---|---|---|---|
| K. aerogenes | 9 | 8 | 3 | 20 |
| K. species | 5 | 5 | 1 | 11 |
| K. oxytoca | 0 | 3 | 1 | 4 |
| K. edwardsii | 0 | 2 | 0 | 2 |
| K. atlantae | 1 | 1 | 0 | 2 |
| K. pneumoniae | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Total | 14 | 21 | 5 | 40 |

TABLEAU 15

MODE DES ESPECES DE KLEBSIELLA DANS LES 3 CLASSES DE GROUPE D'INFECTIONS

| | Infections importantes | | Infections moyennes | | Infections légères | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Milieu Succinate (S') | Milieu Glucose + Succinate (GS') | Milieu Succinate (S') | Milieu Glucose + Succinate (GS') | Milieu Succinate (S') | Milieu Glucose Succinate (GS') |
| K. aerogenes | 0.2-0.3 | 0.2-0.3 | 0.2-0.3 | 0.3-0.4 | 0-0.1 | 0.1-0.2 |
| K. species | 0.3-0.4 | 0.2-0.3 | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | pas de médiane |
| K. oxytoca | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 |
| K. atlantae | 0.2-0.3 | 0.3-0.4 | 0.3-0.4 | 0.1-0.2 | ---- | ---- |

8. E. 2) Variabilité de l'activité phosphatasique culture en milieux S' et GS'

Nous avons établi un quotient pour mieux représenter les activitées légèrement différentes obtenues dans le milieu S' et dans le milieu GS'

$$\frac{/S' - /GS'}{/S' + /GS'}$$

Dans le nominateur de ce quotient /S - GS la représentation signifie /S' - /GS la différence de l'activité dans les deux milieux. Dans le dénominateur /S' + /GS' représente la somme de l'activité dans les milieux. Cette fraction est par conséquent un indice de la variabilité des activités dans les deux milieux. Il est évident que la valeur de la fraction pour Klebsiella qui ne présentent pas de différence des valeurs entre /S' et /GS' est 0. Toutes les valeurs concernant /S' sont négatives et situées à gauche des diagrammes et les valeurs concernant le /GS' sont positives et situées à droite des diagrammes.
Dans ces diagrammes, nous avons classé les valeurs du quotient par ordre décroissant pour le succinate et en passant par les valeurs 0, nous avons classé les valeurs pour /GS' par ordre croissant (vers la droite du diagramme).

Diagramme de K. aerogenes (Fig. 5)

La forme du diagramme est symétrique bien que la partie droite soit plus élevée ce qui signifie une plus grande variabilité des valeurs avec S' et GS'. A noter aussi qu'un nombre presque égal de souches présente des valeurs plus hautes avec le milieu /S' et avec le milieu /GS'.

Klebsiella K. species (Fig. 6)

La forme de la courbe est symétrique et identique à la courbe précédente de K. aerogenes.

Klebsiella K. oxytoca (Fig. 7)

La forme de la courbe est extrêmement différente; en fait, la grande majorité des K. oxytoca présentent des valeurs plus élevées avec le milieu GS' qu'avec le milieu S'. La forme de la courbe est donc dissymétrique (déviation vers la droite).

Conclusion

Les figures 5, 6 et 7 nous montrent que K. oxytoca présente des valeurs plus élevées en présence du glucose (milieu /GS'); K. aerogenes et K. species n'ont pas cette propriété.

Fig. 5
VARIABILITE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE EN MILIEUX S' ET GS'

$$\frac{\text{Activité milieu S' - Activité milieu GS'}}{\text{Activité milieu GS' + Activité milieu S'}}$$ à gauche du 0

$$\frac{\text{Activité milieu GS' - Activité milieu S'}}{\text{Activité milieu GS' + Activité milieu S'}}$$ à droite du 0

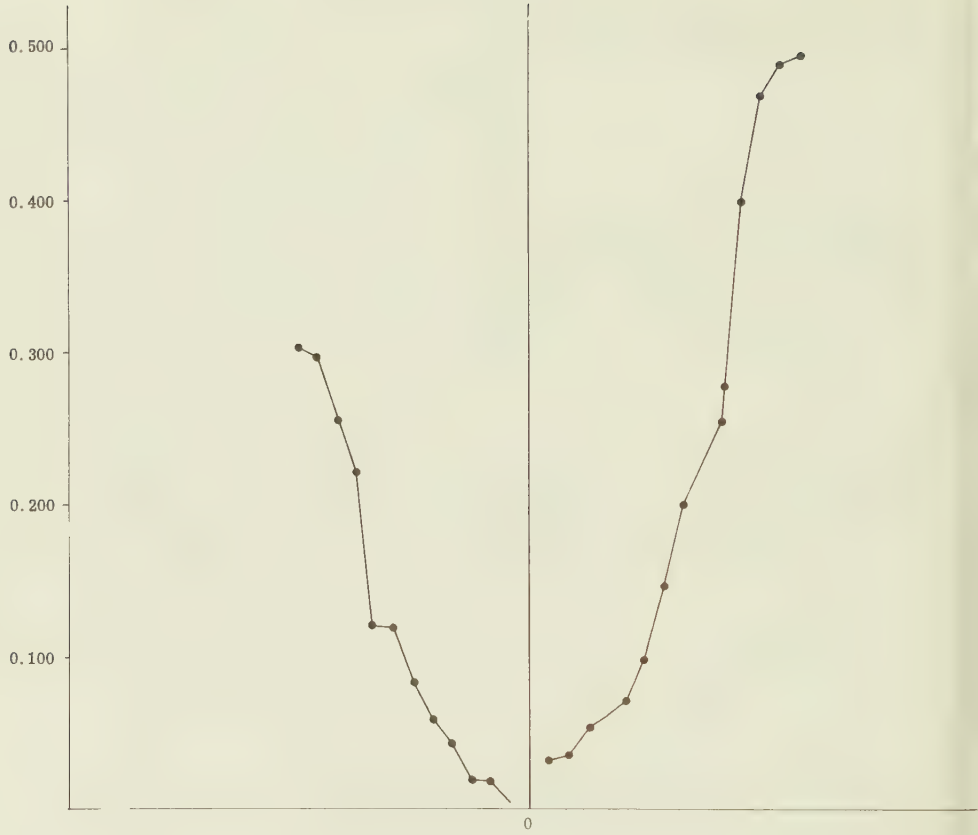



Fig. 6

VARIABILITE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE EN MILIEU S' ET GS

$$\frac{\text{Activité milieu S' - Activité milieu GS'}}{\text{Activité milieu GS' + Activité milieu S'}}$$ à gauche du 0

$$\frac{\text{Activité milieu GS' - Activité milieu S'}}{\text{Activité milieu GS' + Activité milieu S'}}$$ à droite du 0

Fig. 7

VARIABILITE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE EN MILIEUX S' ET GS'

$$\frac{\text{Activité milieu S' - Activité milieu GS'}}{\text{Activité milieu GS' + Activité milieu S'}}$$ à gauche du 0

$$\frac{\text{Activité milieu GS' - Activité milieu S'}}{\text{Activité milieu GS' + Activité milieu S'}}$$ à droite du 0

RESUME

Parmi les espèces du genre Klebsiella, K. species et K. aerogenes présentent des valeurs d'activité de la phosphatase acide les plus élevées; ces valeurs élevées sont accompagnées par un ensemble de critères cliniques qui les classent parmi les infections de gravité importante.

# CHAPITRE 9
# SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

## 9.A) LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Les premiers auteurs qui ont décrit la sensibilité aux antibiotiques, traitent la Klebsiella en même temps que l'Entérobacter. DANS et al., (1967) notent que parmi les malades ayant déjà reçu un traitement aux antibiotiques, la Kanamycine était le seul antibiotique auquel ils restaient sensibles. Les mêmes auteurs notent des interrelations de sensibilité ou de résistance à la Chloramphénicol et à la Kanamycine (facteurs de résistance communs ?); par contre, entre Streptomycine et Kanamycine, les relations de résistance sont moins étroites. Une des données les plus intéressantes, selon ces auteurs, était la relation entre la Kanamycine et les trois antibiotiques suivants:
Chloramphénicol - Tétracycline - Streptomycine.

Presque toutes les souches qui étaient résistantes à la Kanamycine, étaient aussi résistantes aux trois autres antibiotiques. Parmi les souches qui étaient sensibles soit au Chloramphénicol, soit à la Tétracycline, soit à la Streptomycine, 63 à 74 % étaient aussi sensibles à chacun des deux autres. Tandis que parmi celles qui étaient résistantes à un des trois antibiotiques, seul 13 à 17 % étaient sensibles à chacun des trois autres.

Parmi les souches sensibles au Chloramphénicol, à la Tétracycline ou à la Streptomycine, presque toutes étaient aussi sensibles à la Kanamycine, tandis que la moitié des souches résistantes à chacun de ces trois antibiotiques, étaient résistantes à la Kanamycine; 83 % des souches sensibles à la Kanamycine étaient aussi sensibles à la Polymyxine B. Ces phénomènes de résistance multiple, nous les avons étudiés pendant ce travail et nous les exposons plus loin.

DANS et al., (1967) ont trouvé que la Gentamycine était de loin l'antibiotique le plus efficace: ils n'ont trouvé aucune souche ré-

sistante à cet antibiotique parmi 170 malades. Ce résultat correspond exactement avec le nôtre.

Parmi les types capsulaires, le type 24 contacté généralement dans l'hôpital, était le plus résistant aux antibiotiques.

Pour EICKHOFF et al., (1966), la Gentamycine était l'antibiotique le plus efficace. Ensuite vient la Kanamycine (20 % des souches résistantes), la Polymyxine et la Colistine sont moins actives que la Kanamycine. La Streptomycine, la Tétracycline et le Chloramphénicol présentent une petite activité pour la majorité des souches. La Céphalothine présente une activité moyenne. EICHOFF et al., (1966). LERNER et al., (1967) notent l'importance, pour la clinique, de la distinction entre Klebsiella et Entérobacter et ces résultats concernant Klebsiella. Il note que Klebsiella est sensible à la Céphalothine et que cet antibiotique présente une toxicité inférieure au Chlorampnénicol, aux Tétracyclines, à la Kanamycine et à la Polymycine, qui sont en général utilisés pour le traitement des infections à Klebsiella-Entérobacter. EICHOFF et al., remarquent que les types capsulaires 1 à 5 de Klebsiella proviennent en majorité, selon ces auteurs, du système respiratoire et sont plus sensibles au Chloramphénicol, à la Tétracycline et à la Streptomycine et ce, de façon plus uniforme que les autres types capsulaires; le type capsulaire 24 qui concerne plutôt le système urinaire est moins sensible à ces antibiotiques. Selon ces auteurs, des différences de sensibilité existent selon la source de Klebsiella. Ainsi le

Céphalotine, la Tétracycline, le Chloramphénicol, la Streptomycine et dans un moindre degré, la Polymyxine B sont plus efficaces contre les souches provenant du système respiratoire que contre celles provenant d'autres systèmes.

80 % des souches des malades ayant contracté l'infection à l'hôpital, n'étaient pas inhibées par des concentrations de 25 µg/ml

de Chloramphénicol ou de Streptomycine; plus de 20 % de ces souches n'étaient pas inhibées par la même concentration de Kanamycine.

Les malades qui avaient déjà reçu un traitement par les antibiotiques, étaient moins sensibles à la Streptomycine, au Chloramphénicol et à la Tétracycline, ainsi que dans un plus grand degré à la Kanamycine. Par contre, la sensibilité à la Céphalothine des malades ayant déjà reçu un traitement, n'était pas influencée. EICKOFF et al. notent aussi la "résistance croisée", selon leur terme, entre Streptomycine, Néomycine, Paronomycine et Kanamycine.

ZABRANSKY et al. (1969) notent que 57 % ou plus des souches de Klebsiella, sont inhibées par chacun des trois céphalosporines à une concentration de 5 (mcg/ml). La majorité des autres souches étaient inhibées par des concentrations de 10 à 20 mcg/ml des mêmes antibiotiques. La sensibilité à l'Ampicilline est beaucoup moins grande: 17 % des souches sont inhibées par 20 mcg/ml ou moins et 29 % n'étaient pas inhibées par 200 mcg/ml. La conclusion de ces auteurs est que 90 % des souches de Klebsiella sont sensibles aux Céphalosporines.

## 9. B) FACTEURS DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Une souche de Klebsiella K9 a été étudiée récemment par IYVER et IYVER, (1969); elle était résistante aux antibiotiques suivants:

- Chloramphénicol - Tétracycline - Ampicilline -
- Kanamycine - Néomycine - Streptomycine;

ces résistances sont associées à un facteur R et un satellite composé de DNA, qui présente une densité isopycnique (buoyant density) de 1.710 au gradient de chloride de césium. Ce satellite DNA comprend 12 % du DNA total. Les auteurs ont calculé que plusieurs copies de ce facteur de résistance KR9 existent dans cette Klebsiella K9. La résistance de tous les six antibiotiques est transmissible par conjugaison.

L'analyse des facteurs R par des gradients de densité en CsCl (Chlorure de Césium) démontre que les facteurs R sont composés de deux éléments génétiques:

a) le facteur de transfert responsable de l'autonomie de l'épisome,

b) les déterminants de résistance qui donnent à l'épisome la propriété de résistance.

Les facteurs de transfert T, qui donnent aux déterminants non transférables la capacité du transfert, sont présents très fréquemment chez les Entérobactéries.
MITSUHASHI, (1971) cite que parmi cinq souches de Klebsiella testées, deux possédaient des facteurs T de transfert.

## 9. C) MATERIEL ET METHODES

Pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous avons utilisé la méthode de diffusion à partir des disques chargés de quantités définies de chaque antibiotique. Les disques pour chaque antibiotique ont été chargés de la façon suivante.

Ampicilline 25 µg, Tétracycline 50 µg, Céphalovine 30 µg, Chloramphénicol 50 µg, Sulfadiazine 300 µg, Trimethoprim 25 µg, Ac. Nalidixique 30 µg, Nitrofurantoine 200 µg, Gentamycine 10 µg.

L'inoculum était standardisé et contenait $10^5$ bactéries par ml. La lecture a été faite après incubation à 37 $^{o}$C pendant 18 heures. L'interprétation est donnée à deux catégories des bactéries: sensibles ou résistantes.

### 9. C. 1) Résultats des antibiogrammes

Ensemble des souches

8 % des souches sont (complètement) sensibles. Klebsiella présentent une moindre résistance aux antibiotiques suivants:

| ANTIBIOTIQUES | % des souches résistantes |
|---|---|
| a) Gentamycine | 0 % |
| b) Nitrofurantoine | 8 % |
| c) Acide Nalidixique | 8 % |
| d) Chloramphénicol | 15 % |
| e) Céphalotine | 31 % |
| f) Trimethoprim | 26 % |
| g) Tétracycline | 53 % |
| h) Ampicilline | 80 % |

L'Ampicilline est de loin l'antibiotique (parmi ceux que nous avons testés), vis-à-vis duquel Klebsiella présente le plus grand pourcentage de résistance: 80 %. Cette résistance à l'Ampicil-

line est due à la présence d'une pénicillinase de provenance plasmidique (SAWAI, YAMAGISH et MITSUHASHI, 1973).

9. C. 2) K. aerogenes

K. aerogenes présentent une moindre résistance aux antibiotiques suivants:

| ANTIBIOTIQUES | % des souches résistantes |
|---|---|
| a) Gentamycine | 0 % |
| b) Nitrofurantoine | 12. 50 % |
| c) Acide Nalidixique | 12. 50 % |
| d) Chloramphénicol | 20. 83 % |
| e) Céphalotine | 31. 25 % |
| f) Trimethoprim | 37. 50 % |
| g) Tétracycline | 60. 47 % |
| h) Ampicilline | 83. 67 % |

Nous observons ici des pourcentages relativment élevés pour les souches résistantes. A noter qu'un nombre important des K. aerogenes sont multirésistants à plusieurs antibiotiques et que certains types d'associations de résistance comme les types d'association Ampicilline-Tétracycline (ATe) ou Ampicilline, Céphalotine - Tétracycline (A Ce Te) caractérisent cette espèce de Klebsiella (BONIFAS et COMNINOS, résultats non publiés).

9. C. 3) K. species

K. species présentent une moindre résistance aux antibiotiques suivants:

| ANTIBIOTIQUES | % des souches résistantes |
|---|---|
| a) Gentamycine | 0 % |
| b) Nitrofurantoine | 0 % |
| c) Acide Nalidixique | 3.84 % |
| d) Trimethoprim | 15.38 % |
| e) Chloramphénicol | 23.08 % |
| f) Céphalotine | 38.46 % |
| g) Tétracycline | 61.53 % |
| h) Ampicilline | 80.76 % |

9.C.4) K. oxytoca

K. oxytoca présentent une moindre résistance au antibiotiques suivants:

| ANTIBIOTIQUES | % des souches résistantes |
|---|---|
| a) Gentamycine | 0 % |
| b) Nitrofurantoine | 0 % |
| c) Acide Nalidixique | 0 % |
| d) Chloramphénicol | 0 % |
| e) Trimethoprim | 6.25 % |
| f) Tétracycline | 6.25 % |
| g) Céphalotine | 18.75 % |
| h) Ampicilline | 81.25 % |

Nous observons ici des pourcentages très faibles de résistance de K. oxytoca, ce qui contraste avec les pourcentages élevés de K. aerogenes et de K. species. Par conséquent, si on considère que Klebsiella sont par excellence les bactéries porteuses des plamides-facteurs des résistances aux antibiotiques (NESTER, ROBERTS, MC CARTHY and PEARSALL, 1973, UMSAWASDI, MIDDLEMAN, LUNA and BODEY, 1973), cette constatation concerne essentiellement K. aerogenes et K. species et beaucoup moins K. oxytoca.

RESUME

Toutes les souches de Klebsiella sont sensibles à la Gentamycine. La comparaison, en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques entre K. aerogenes et K. oxytoca est frappante, K. aerogenes est souvent résistante à plusieurs antibiotiques, tandis que les pourcentages de résistance de K. oxytoca sont très faibles.

# CHAPITRE 10
# CORRELATION ENTRE SEROLOGIE ET ESPECES BIOCHIMIQUES

10. A) DIFFERENCES ENTRE K. AEROGENES ET K. SPECIES

a) La fréquence du type capsulaire 1 est élevée pour K. aerogenes (13 %), basse pour K. species (5 %).

b) La fréquence du type capsulaire 3 est plus élevée pour K. species (4 %), que pour K. aerogenes (2 %) (à noter ici que le gonflement de K. aerogenes est faible).

c) La fréquence du type capsulaire 7 est plus élevée pour K. species (24 % - valeur la plus haute du type 7 chez toutes les espèces du Klebsiella) que pour K. aerogenes (15 %).

d) Présence des types capsulaires 8-9, 10, 11 et 13 pour K. aerogenes et absence pour K. species.

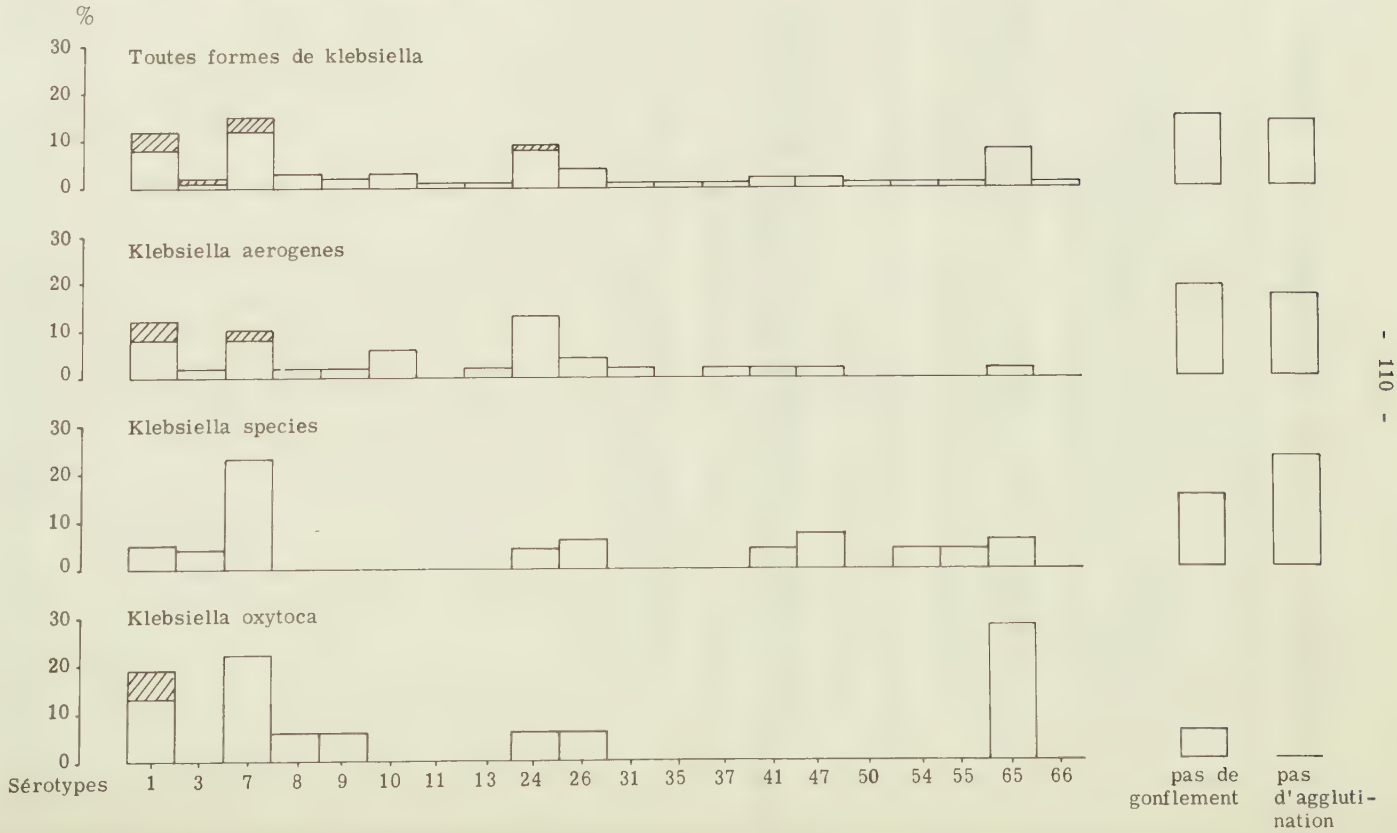
e) La fréquence du type capsulaire 24 [1)] est plus élevée pour K. aerogenes (13 %) que pour K. species (4.5 %) (à noter que pour K. species, le gonflement est faible).

f) La fréquence du type capsulaire 26 est plus élevée pour K. species (6 %) que pour K. aerogenes (4,5 %). (voir Fig. 8)

1) A noter que ce type capsulaire 24 est endémique dans les hôpitaux des Etats-Unis.

Fig. 8

Distribution des pourcentages d'après le sérotype produisant un gonflement (en noir) ou un gonflement faible (en rouge)
Klebsiella - toutes formes; aerogenes; species; oxytoca



10. B) DIFFERENCE ENTRE K. AEROGENES ET K. OXYTOCA

a) La fréquence du type capsulaire 1 est plus élevée pour K. oxytoca (19 %) (valeur la plus haute parmi toutes les espèces de Klebsiella) que pour K. aerogenes (15,2 %).

b) Le type capsulaire 3 est présent chez K. aerogenes et absent chez K. oxytoca.

c) La fréquence du type capsulaire 7 est plus élevée pour K. oxytoca (22 %) que pour K. aerogenes (16 %).

d) La fréquence des types capsulaires 8 et 9 est plus élevée pour K. oxytoca (6,2 %) pour chaque type que pour K. aerogenes (3 % et 2 % respectivement).

e) Le type capsulaire 10 est présent chez K. aerogenes et absent chez K. species.

f) La fréquence du type capsulaire 24 [1] est plus élevée chez K. aerogenes (11,5 %) que chez K. oxytoca (6,2 %) (le gonflement est faible pour K. oxytoca).

g) La différence fondamentale entre K. oxytoca et K. aerogenes concerne le type capsulaire 65 [2]. En fait le type capsulaire 65 est très fréquent chez K. oxytoca (28 %) et rare chez K. aerogenes (2 %).

h) Autre différence fondamentale entre K. aerogenes et K. oxytoca: la fréquence des souches qui ne présentent pas de gonflement et celles qui ne présentent pas d'agglutination: en fait, elles sont très élevées pour K. aerogenes (21 %) et (21 %) et très basses pour K. oxytoca (6.24%), ne présentent pas de gonflement et aucune ne présente d'agglutination.

En d'autres terme, K. oxytoca sont typisables dans une très forte proportion (voir Fig. 8).

---

1) A noter que le type 24 est endémique dans les hôpitaux des Etats-Unis.
2) Ce type a été isolé à Bâle chez un singe.

10. C) DIFFERENCES ENTRE K. SPECIES ET K. OXYTOCA

a) La fréquence du type capsulaire 1 est beaucoup plus élevée pour K. oxytoca (19 %) que pour K. species (5 %).

b) Le type capsulaire 3 est présent chez K. species et absent chez K. oxytoca.

c) Les types capsulaires 8 et 9 sont absents chez les K. species et présents chez K. oxytoca (6,5 % pour chaque type).

d) De nouveau une différence fondamentale entre K. oxytoca et K. species concernant le type 65. Il est très fréquent chez K. oxytoca (28 %) et rare chez K. species (6 %).

e) Les souches qui ne présentent pas de gonflement (mais qui ont des agglutinations positives sont fréquentes chez K. oxytoca (6,2 %).

f) Les souches qui ne présentent pas d'agglutination sont très nombreuses chez les K. species (23 %) et 0 chez les K. oxytoca; c'est aussi une différence frappante: toutes les souches de K. oxytoca sont typisables (voir Fig. 8).

RESUME

Nous constatons que la corrélation des données biochimiques et sérologiques entre types capsulaires parmi les différentes espèces de Klebsiella, démontre des affinités entre K. aerogenes et K. species et des différences entre K. aerogenes et K. oxytoca, entre K. species et K. oxytoca. Cette constatation pourrait avoir une signification taxonomique.

# CHAPITRE 11
# CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Genre Klebsiella

Les types capsulaires les plus fréquents sont:

a) le type capsulaire 7 12 % des souches
b) le type 1 7 % des souches
c) le type 24 7 % des souches
d) le type 65 7 % des souches

2. K. aerogenes

Elle se distingue des deux autres espèces les plus fréquentes (K. species et K. oxytoca) par une fréquence du type capsulaire 65 très bas (2 %) et par un type capsulaire 1 fréquent (15,5 %), ainsi que par l'absence des types 3 et 10; le type capsulaire 7 est moins fréquent que chez les deux autres espèces (8 %).

3. K. species

Elle est caractérisée par une fréquence élevée (26,2 %) du type capsulaire 7 et par l'absence des types capsulaires 8, 9, et 10.

4. K. oxytoca

Elle est caractérisée par une fréquence élevée (28,2 %) du type capsulaire 65 (distinction de K. oxytoca avec K. aerogenes et K. species, qui présentent une fréquence très basse).

Le type 7 est assez fréquent (22,5 %) mais moins fréquent que parmi K. species; le type capsulaire 1 est plus fréquent (19 %) que parmi les deux autres espèces; le type 10 est absent.

TABLEAU 16

DIFFERENCE ENTRE K. AEROGENES ET K. SPECIES D'UNE PART ET K. OXYTOCA D'AUTRE PART

| | Activité en milieu S | Phosphatase en milieu GS | rapport GS/S [1] (en nombre de souches) | Fréquence clinique élevée d'infections | Sérologie | Pourcentage de gonflement positif | Sensibilité aux antibiotiques |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K. aerogenes | 0.2-0.3 | 0.2-0.3 | 1 | sévères | type capsulaire divers | 79 % | polyrésistante |
| K. species | 0.3-0.4 | 0.2-0.3 | 1 | sévères | type capsulaire 7 fréquent (26.3%) | 74 % | polvrésistante |
| K. oxytoca | 0.1-0.2 | 0.1-0.2 | 15 | bénigne | type capsulaire 65 fréquent (28.2%) | 93.8 % | sensible ou monorésistante |

1) Remarque: Dans la fraction $\frac{GS}{S}$ nous mettons au nominateur le nombre des souches qui ont une activité plus élevée en milieu GS que en milieu S; au dénominateur nous mettons le nombre des souches qui ont une activité plus élevée en milieu S qu'en milieu GS.

## RESUME ET CONCLUSION FINALE

Le tableau 16 récapitule les résultats du travail expérimental de cette thèse, dans lequel on verra:

a) une activité phosphatasique élevée pour K. species et K. aerogenes et une activité phosphatasique basse pour K. oxytoca;

b) la présence d'une résistance marqué aux antibiotiques pour K. aerogenes et species et la sensibilité aux antibiotiques de K. oxytoca;

c) une plus grande pathogenicité pour K. aerogenes et K. species et une légère pour K. oxytoca.

d) Chaque espèce de Klebsiella est caractérisée par une fréquence de type capsulaire particulière.

La présence d'une activité phosphatasique caractérise le genre Klebsiella. Une corrélation existe entre la pathogenicité des souches et la valeur de la phosphatase acide.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMSON C.
Staphylococcal Enzymes. IV. Phosphatase.
In "The Staphylococci"
Edit by Cohen, Wiley-Interscience, 1793.

BARBER M. and KUPER S.
Identification of Staphylococcus pyogenes by the phosphatase reaction.
J. Path. Bacter., 1951, 63, 65.

BARKER S.A.J.S., ERIKSEN J.L. and STACEY M.
Capsular polysaccharide of Klebsiella pneumoniae Type A
(Stein, 1965).
Nature London 1963, 197, 899.

BARRAUD A., MONTANDON A., NAGER F., RUEDI L., SCHLITTLER E. et TAILLENS J.
Précis d'Oto-Rhino-Laryngologie.
Editions S. Karger S.A., Bâle, 1952, pp. 241-249

BARRITT M.M.
The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of a-naphtol.
J. Path. Bacter., 1936, 42, 441.

BASCOMB S., LAPAGE S., WILLCOX W. and CURTIS M.
Numerical Classification of the Tribe Klebsiellae.
J. of Gen Microb., 1971, 66, 279.

BEESON P.
Pyelonephritis.
In CECIL-LOEB "Textbook of Medicine".
Edited by BEESON P. and McDERMOTT W., pp. 806-809.
W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1967.

BERGEY D.H.
Manual of determinative bacteriology.
1923 1ère édition, 1925 2ème édition, 1934 3ème édition, 1974 8ème édition.

BOHME A.
Die Anwendung der Ehrischschen Indolreaktion für bacteriologische Zwecke.
Centr. Bacter. I Abt. Orig., 1905, 40, 129.

BOLTON P.G. and A.C.R. DEAN
Phosphatase synthesis in Klebsiella (Aerobacter).
Biochem. J. 1972, 127, 87.

BONIFAS V. et G. COMNINOS
Association de facteurs de résistance selon les espèces de Klebsiella.
Résultats non publiés.

BURNS J. and HOLTMAN D.
Biochemical properties of virulent and avirulent Staphylococci.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 88, 1115.

CANNON F. and HAWN C.
Phosphatase activity of Staphylococcus aureus: correlation of enzyme production with resistance to penicillin and phage pattern.
J. Bacter., 1963, 86, 1052.

CAPET R.G.
Aide-mémoire de détermination bactérienne.
Vigot Frères, Paris, 1970.

COHEN G.
Le métabolisme cellulaire et sa régulation.
Herman Editeur, Paris, 1971.

COWAN S.T.
(Chairman, Commité international de nomenclature bactérienne).
International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy, 1963, 13, 69.

COWAN S.T., STEEL J.K., SHAW C. and DUGUID J.P.
A classification of the Klebsiella group.
J. gen Microb., 1960, 23, 601.

COWAN S. and STEEL K.
Identification of medical bacteria.
Cambridge University Press, 1974.

DANS P., BARRET F., CASEY J. and FINLAND M.
Klebsiella-Enterobacter at Boston City Hospital, 1967.
Arch. Intern. Med., 1970, 125, 24.

DAVIS B., DULBECCO R., EISEN H., GINSBERG H. and WOOD W.
Pathogenicity and virulence, pp. 606-607.
In Microbiology.
Hosber Medical Division, New York, Evanston and London,
Sixth Printing with corrections, 1970.

DAVIS G. and WOOLHOUSE N.
Taxonomy of Klebsiella and non-fermenting Gram negative bacteria isolated from clinical materials.
The West Afr. Med. J., 1966, 15, 69.

DUDMAN W.F. and WILKINSON J.F.
The composition of the Extracellular Polysaccharides of Aerobacter Klebsiella strains.
Biochem. J., 1965, 62, 289.

DUGUID J.P.
Fimbriae and adhesive properties of Klebsiella strains.
J. Gen. Microb., 1959, 21, 271.

DURLAKOWA I., LACHOWICZ Z., SLOPEK S.
Serologic characterisation of Klebsiella Bacilli on the basis of properties of the capsular antigens.
Arch. Immunol. et Therap. Exp., 1967, 15, 497.

DURLAKOWA I., LACHOWICZ Z. and SLOPEK S.
Biochemical properties of Klebsiella Bacilli.
Arch. Immun. et The. Exp., 1967, 15, 490.

EDMONDSON E. and SANFORD J.
The Klebsiella-Enterobacter (Aerobacter) - Serratia group.
Medicine, 1967, 46, 323.

EDWARDS P. and EWING W.
Identification of enterobacteriaceae.
Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, 1972.

EICKOFF T., STEINHAUER B., FINLAND M.
The Klebsiella-Enterobacter-Serratia Division.
Biochemical and Serologic Characteristics and Susceptibility to Antibiotics.
Ann. Inter. Med., 1966, 65, 1163.

ELEK S.
Staphylococcus pyogenes and its relation to disease.
E. and S. Livingstone, London, 1959.

ERIKSEN J.
Comparison of the capsular polysaccharides isolated from Klebsiella Pneumoniae type 1, 2 and 3.
Arch. Immun. Ther. Exp., 1968, 16, 260.

ERIKSEN J. and ERIKSEN S.D.
Immunochemical studies on some serological cross-reactions in the Klebsiella group.
Acta path. microb. Scand., 1962, 54, 387.

FIFE M., EDWING W. and DAVIS B.
The biochemical reactions of the tribe Klebsielleae.
U.S. Department of Health, Education and Welfare.
Public Center Service, Atlanta, Georgia, 1965.

FINLAND M.
Klebsiella Pneumonia.
In CECIL LOEB Textbook of Medicine.
Edited by BEESON P. and McDERMOTT W., pp. 159-161.
W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1967.

FINLAND M.
Excursions into Epidemiology: Selected Studies during the Past Four Decades at Boston City Hospital.
J. Infect. Dis., 1973, 128, 76.

FOSTER W.D., BRAGG J.
Biochemical classification of Klebsiella correlated with the severity of the associated disease.
J. Clin. Path., 1962, 15, 478.

FRIEDLANDER C.
Ueber die Schiromycetes bei der acuten Fibros in Pneumonia.
Virchows Arch., 1882, 87, 319.

GAHAN L.C., SANDFORD P.A. and CONRAD H.E.
The structure of the Serotype 2 Capsular Polysaccharide of Aerobacter aerogenes.
Biochemistry N.Y., 1967, 6, 2755.

GRAY C.
Enzyme-catalysed hydrolysis of phosphate esters. pp. 209-211.
In Enzyme Catalysed Reactions.
Van Nostrand Reinhold Company, London, 1971.

GREEN J., PIGOTT N., BOLIN R. and HARRELL W.
Use of Acetone-Dried Vaccines for Preparing Capsular Antisera Against the Klebsiella Group and the Lyophilization of Klebsiella Cultures.
Appl. Microbiol., 1970, 20, 416.

GREENBERG E. and PREISS J.
The occurrence of adenosine diphosphate glucose: glycogen transglucosylase in bacteria.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 4314.

HARRISON D. and MAITRA P.
Control of Respiration and Metabolism in Growing Klebsiella aerogenes. The role of Adenine nucleotides.
Biochem. J., 1969, 112, 647.

HEIDELBERGER M., DUDMAN W.F. and NIMICH W.
Immunochemical relationships of certain capsular polysaccharides of Klebsiella, Pneumococci and rhirobia.
J. Immunol., 1970, 104, 1321.

HERIKSEN S.D.
Studies on the Klebsiella Group (KAUFFMANN)
III. Demonstration of the M-antigen 66 Escherichia coli in Klebsiella aerobacter.
Acta path. Microb. Scand., 1954, 34, 266.

HOLLANDER V.
Acid Phosphatase.
in "The Enzymes" Edit. by Paul Boyer, Vol. TV.
Academic Press, New York and London, 1971.

IYER R. and IYER V.
Genetic and Molecular Properties of an Infections Antibiotic.
Resistance (R) Factor Isolated From Klebsiella.
J. Bact., 1969, 100, 605.

KATSUKI H., TAKED K., KAMEDA K. and TANAKA S.
Existence of two malic enzymes in E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 331.

KAUFFMANN F.
On the serology of the Klebsiella Group.
Acta path. Microb. Scand, 1949, 26, 381.

KAUFFMANN F.
The Bacteriology of Enterobacteriaceae.
Munksgaard, Copenhagen, 1969.

KITASATO S.
Die negative Indolreaktion der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen Bazillenarten.
Z. Hyg. Infect., 1889, 7, 515.

KLIGER J.
A simple Medium for the Differentiation of Members of the Typhoid-Parathyphoid Group.
Am. J. Publ. Hlth, 1917, 7, 1042.

KOVACS N.
Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction.
Nature, 1956, 178, 703.

LARNER J.
Intermediary Metabolism and its Regulation.
Prentice-Hall Inc. New Jersey 1971.
Engelwood Cliffs.

LAUTROP HANS.
Gelatin-liquefying Klebsiella strains (bacterium oxytoca).
Acta path. Microb. Scand., 1956, 39, 375.

LE BOUAR Y.
Enterobacteries V.P., pp. 299-307.
Daguet G. "Techniques en bactériologie", 1. Aerobies.
Flammarion Edit. Paris, 1972.

LERNER P. and WINSTEIN L.
The differentiation of Klebsiella from Aerobacter species by sensitivity to Cephalothins and Penicillins.
The Amer. J. of Med. Sci., 1967, 254, 85.

LE MINOR L.
Enterobacteries, pp. 234, 240.
In G.L. DAGUET "Techniques en bactériologie".
Flammarion Edit. Paris, 1972.

LO D.
Klebsiella septicaemia, disseminated intravascular coagulation and ulcerative colitis in an Australian aboriginal.
The Med. J. of Australia, 1971, 58, 1279.

MAHLER H.R., CORDES E.H.
The control of Glucose Metabolism, pp. 443-444.
In "Biological Chemistry".
Harper and Row, New York, Evanston and London, 1968.

MALVEAUX F. and SAN CLEMENTE C.
Elution of loosely bound acid phosphatase from Staphylococcus aureus.
App. Microb., 1967, 15, 738.

MARESZ - BABCZSZYN J.
New antigenic types of Klebsiella bacilli.
Arch. Immun. Ther. Exp., 1962, 10, 589.

MITSUHASHI S.
Epidemiology of bacterial drug-resistance, p. 5.
In "Transerable Drug Resistance Factor".
University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 197..

NESTER E., ROBERT C., McCARTHY B., and PEARSAL N.
Klebsiella Pneumoniae.
In "Microbiology".
Holt. Rinahart and Winston Inc., New York, 1973.

NUMMICH W.
Zur Frage der Bindung von Kapsel-Antigenen Bestandteilen der Bakterienzellwand.
Acta biol. med. germ (1969), 22, 191.

ØRSKOV I.
Lettre personnelle du 7. 9. 1971.

ØRSKOV I.
The biochemical properties of Klebsiella strains (Klebsiella aerogenes).
Acta path. Microb. Scand., 1955, 37, 253.

PAIGEN K. and WILLIAMS B.
Catobolite repression and Other Control Mechanisms in Carbohydrate Utilisation.
Article in "Advances in Microbial Physiology", Vol. 4.
Academic Press, London.

PAN Y. and BLUMENTHAL H.
Correlation between acid phosphatase and coagulase production of phage type of Staphylococcus aureus.
J. Bact., 1961, 82, 124.

PETERSDORF R.
Article "Septic shock", pp. 736-739.
Harrison's Principles of Internal Medicine.
McGrew-Hill Book Company, New York, 1970.

PICKET M.J. and NELSON E.L.
Speciation within the genus Brucella IV Fermentation of carbohydrates.
J. Bact., 1955, 69, 333.

POLONOVSKI M.
Biochimie Médicale. Fascicule II.
8ème édition revue et corrigée par BOULANGER P., POLONOVSKI J., TAYEAU F., MANDEL P. et BISERTE G.
Masson et Cie Edit., Paris, 1967.

RICHTERICH R.
Phosphatase acide de la phostase, pp. 414-419.
In "Chimie Clinique théorique et pratique".
Editions Doin, Paris, 1967.

ROSE STEVEN
La chimie de la vie.
Gauther-Villars Edit., Paris, 1971.

SANFORD J., HUNER B., AKINS L. and BARNET J.
Immunity and obstructive uropathy as determinants in the pathogenesis of experimental pyelonephritis with observations on the distribution of antibody in hydronephrotic kidneysin. "Progress in Pyelonephritis".
Edité par Ed. H. Kass, F.A. Davis Company, Philadelphia, 1965, pp. 225-271.

SANWAL B.D.
Allosteric Controls of Amphibolic Pathways in Bacteria.
Bact. Rev., 1970, 34, 20.

SANWAL B. and SMANDO R.
Malic enzyme of Escherichia coli: diversity of effectors controlling enzyme activity.
J. Brol. Chem., 1969, 244, 1817.

SAWAI T., YAMAGISHI S. and MITSUHASHI S.
Penicillinases of Klebsiella pneumoniae and their phylogenetic relationship to penicillinases mediated by R. factors.
J. Bact., 1973, 115, 1045.

SAWASHIGE E.
Electron microscopic studies on the enzymatic activities in the membrane system of staphylococci.
J. Electron Microscopy, (Tokyo) 1967, 16, 293.

SAGEL I., CATTANEO J. and SIGAL N.
The regulation of glycogen synthesis in Aerobacter aerogenes.
Colloq. int. Centr. Nat. Rech. Sci., Paris, No 124, 1965, 337.

SENEZ J.
Microbiologie générale.
Doin Edit., Paris 1968.

SHAW C. and CLARKE
Biochemical classification of Proteus and Providence cultures.
J. gen. Microb., 1955, 13, 155.

SIMMONS J.S.
A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi.
J. Infect. Dis., 1926, 39, 209.

SLOPEK S. and DURLAKOWA I.
Studies on the taxonomy of Klebsiella Bacilli.
Arch. Immun. Ther. Exp., 1967, 15, 481.

SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS
Manual of Microbiological Methods.
McGraw-Hill Co, New York, 1957.

SOKATCH John
Bacterial Physiology and metabolism.
Academic Press, London and New York, 1969.

STANIER R., SOUDOROFF M. and ADELBERG E.
General Microbiology.
Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1971.

STEINHAUER B., EICKHOFF T., WARD KISLAK J., FINLAND M.
The Klebsiella, Enterobacter, Serratia Division.
Clinical and Epidemiologic Characteristics.
Ann. Inter. Med., 1966, 65, 1180.

STUART C., VANTSTRATUM E. and RUSTIGIAN R.
Further studies on urease production by Proteus and related organisms.
J. Bact., 1945, 49, 437.

SUTHERLAND I. W.
Bacterial Exopolysaccharides from the "Advances in Microbial Physiology", 1972, 8, 143.

TAYLOR Welton J.
Isolation of Shigellae xylose lysine agars; new media for isolation of Enteric pathogens.
Amer. J. Clinc. Path., 1965, 44, 471.

THALER M. M.
Klebsiella-Aerobacter Pneumonia in infants.
A Review of the Literature and Report of a Case.
Pediatries k862, 30, 206.

THIMANN Keneth
Indole production.
In "The Life of Bacteria" du même auteur.
McMillan Company, New York, 1963.

THOMAS M.
A blue peroxide slide catalase test.
Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv. (1963), 22, 124.

TREVISAN V.
Sui batteri spettanti al genere Klebsiella.
R.C. Instit. Lombardo, Série 2, 1888, 21, 777.

TRIPODI D.
Klebsiella and Enterobacter, pp. 127-131.
In "Analytical Serology of Microorganisms".
Edited by J. B. C. KWAPINSKI, Interscience Publishers, New York,
London, Sydney, Toronto, 1969.

TROY F., FRERMAN F., HEATH D.
The biosynthesis of capsular polysaccharide in Aerobacter aerogenes.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 118.

UMSAWASOI T., MIDDLEMAN E., LUNA M. and BODEY G.
Klebsiella bacteriemia in cancer patients.
The Amer. J. Med. Sci., 1973, 265, 473.

VON HOFSTEN B. and PORATH J.
Purification and some properties of an acid phosphatase from Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 64, 1.

WILLIAMS R. and LANSFORD E.
Phosphatases, pp. 639-640.
In "The Encyclopedia of biochemistry".
Reinhols Publishing Corporation, New York, 1967.

WOOD W. B. Jr.
Pneumococcal Pneumonia.
In Cecil-Loeb's "Textbook of Medicine" Edited by Beeson et McDERMOTT W., Saunders Company Philadelphia and London, 1967.

YUREWICZ E., GHAMBOR M., HEATH E.
The structure of Aerobacter aerogenes capsular polysaccharide.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 5596.

ZABRANSKY R., HALL J., DAY F., NEEDAM G.
Klebsiella, Enterobacter and Serratia: Biochemical differentiation and susceptibility to Ampicillin and three cephalosporin derivatives.
Appl. Microbiol., 1969, 18, 198.